

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO**


**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA**

**GENETICA E BIOLOGIA CELLULARE- XXI CICLO**


**L'oncoproteina E7 di Human Papillomavirus  
interagisce con la proteina cellulare GSTP1 e ne  
modula la funzionalità**

**BIO/11**

Coordinatore: Prof. Giorgio Pantera (Dip. Agrobiologia e Agrochimica,  
Univ. La Tuscia, Viterbo)

Firma 

Tutor: Dott. Armando Felsani (EBRI, CNR, Roma).

Firma 

Co-Tutor: Dott. Marco Giorgio Paggi (CRS, IRE, Roma)

Firma



Dottorando: Stefano Mattarocci

Firma



# INDICE

<b>Capitolo 1 – INTRODUZIONE</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Il Papillomavirus e i suoi meccanismi di trasformazione cellulare</b>	<b>5</b>
1.1.1 I Papillomavirus umani	7
1.1.2 Il ciclo biologico degli HPV	8
1.1.3 Il genoma di HPV	11
1.1.4 Le proteine E1, E2, E4 e E5	12
1.1.5 La proteina E6	15
1.1.6 La proteina E7	17
1.1.7 Meccanismi molecolari del ciclo vitale	24
1.1.8 Integrazione del genoma degli HPV	28
<b>1.2 Fattori che interagiscono con le oncoproteine di HPV</b>	<b>31</b>
1.2.1 La famiglia delle Glutathione S-Transferasi	32
1.2.2 La proteina GSTP1 (Glutathione S-Transferasi di classe p)	35
<b>Capitolo 2 - SCOPO DELLA TESI</b>	<b>41</b>
<b>Capitolo 3 - MATERIALI E METODI</b>	<b>44</b>
3.1 Costrutti plasmidici	44
3.2 Mutagenesi sito-specifica	45
3.3 Colture cellulari	46
3.4 “Mimotopes <sup>®</sup> technology”	47
3.5 Studio molecolare dell’interazione tra GSTP1 e il	

	dominio CR3 di E7 HPV-16 (modello docking)	48
3.6	Trasformazione di <i>E.Coli</i>	49
3.7	Estrazione del DNA plasmidico da ceppi batterici	50
3.8	Sintesi delle proteine di fusione	51
3.9	Saggio di interazione <i>in vitro</i>	52
3.10	Sistemi di espressione ectopica in cellule eucariotiche	53
3.11	Infezioni retrovirale	54
3.12	Silenziamento dell'espressione genica di GSTP1 ("small interference RNA")	55
3.13	Valutazione dell'espressione proteica (saggio Western blot)	56
3.14	Analisi dell'equilibrio redox cellulare	58
3.14.1	Analisi dei TBARS (sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico)	58
3.14.2	Analisi dei PUFA (acidi grassi poli-insaturi)	59
3.14.3	Analisi dell'attività di enzimi anti-ossidanti	59
3.14.4	Attività enzimatica della GSTP1	60
3.14.5	Determinazione del contenuto cellulare di GSH	61
3.15	Metodi chimico – fisici per l'induzione di morte cellulare	62
3.15.1	Irradiazione con UV	62
3.15.2	Trattamento con perossido di idrogeno	62
3.16	Analisi della vitalità cellulare	62
3.17	Saggio TUNEL	63
3.18	Analisi statistica dei risultati sperimentali	64

## **Capitolo IV - RISULTATI** 65

4.1	Identificazione della zona d'interazione tra E7 HPV-16 e GSTP1	65
4.2	Modello molecolare dell'interazione tra il dimero del	

	<b>dominio CR3 di E7 e GSTP1 (Docking Model)</b>	<b>66</b>
<b>4.3</b>	<b>Mutagenesi sito-specifica della proteina E7</b>	<b>72</b>
<b>4.4</b>	<b>Analisi dell'espressione e dell'attività enzimatica di GSTP1 in cellule HaCaT infettate con E7</b>	<b>74</b>
<b>4.5</b>	<b>Analisi dei livelli proteici di GSTP1 in cellule Phoenix trasfettate in modo transiente con E7</b>	<b>77</b>
<b>4.6</b>	<b>Alterazioni nell'equilibrio redox cellulare in presenza di E7</b>	<b>79</b>
<b>4.7</b>	<b>Analisi dell'influenza di E7 sull'attività regolatoria di GSTP1</b>	<b>81</b>
<b>4.7.1</b>	<b>Protezione dall'ossidazione di GSTP1 nelle cellule infettate con E7</b>	<b>81</b>
<b>4.7.2</b>	<b>La presenza di E7 causa una diminuzione dei livelli di fosforilazione di JKN1</b>	<b>85</b>
<b>4.8</b>	<b>Ruolo di E7 sulla sopravvivenza cellulare in cellule HaCaT e MCF-7</b>	<b>86</b>
<b>4.9</b>	<b>Visualizzazione dei corpi apoptotici (saggio TUNEL)</b>	<b>89</b>
<b>4.10</b>	<b>Ruolo di E7 e GSTP1 nella sopravvivenza cellulare dopo irradiazione con UV</b>	<b>91</b>
	 <b>Capitolo 5 - DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>	 <b>94</b>
	 <b>BIBLIOGRAFIA</b>	 <b>100</b>

# **1 INTRODUZIONE**

## **1.1 Il Papillomavirus e i suoi meccanismi di trasformazione cellulare.**

### **1.1.1 I Papillomavirus umani**

I Papillomavirus sono piccoli virus a DNA ampiamente distribuiti nel regno animale e hanno la caratteristica di essere strettamente tessuto-specifici. Le regioni anatomiche coinvolte nell'infezione sono la cute oppure la mucosa. In particolare, questi virus mostrano un tropismo ristretto alle cellule del tessuto epiteliale (epiteli cutanei e mucosi di tipo squamoso) inducendo lesioni iperproliferative.

I Papillomavirus appartengono alla famiglia dei Papillomaviridae e vengono suddivisi in 16 diversi generi in base alle proprietà biologiche e all'organizzazione del genoma. La maggior parte dei Papillomavirus umani (HPV) appartengono ai generi  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Ciascun genere è suddiviso in specie e tipo, identificati in base a dati epidemiologici e di omologia di sequenza (De Villiers et al., 2004; Munger et al., 2004). Tale classificazione ha una valenza fisiopatologica: infatti, gli  $\alpha$ -HPV provocano nell'uomo lesioni mucoso-cutanee nell'area genitale; i  $\beta$ -HPV e i  $\gamma$ -HPV provocano lesioni cutanee lievi o in forma latente, ma possono assumere andamento florido in condizioni d'immunosoppressione.

Gli HPV infettano gli epiteli squamosi in differenti e specifici siti anatomici. L'epitelio anogenitale può essere infettato da circa 30 diversi

HPV; altri sono stati rilevati specificatamente nella mucosa orale (Longworth and Laimins, 2004a). Le infezioni del tratto genitale da parte degli HPV rappresentano una delle più comuni malattie a trasmissione sessuale.

Come accennato all'inizio, i Papillomavirus umani possono essere classificati in HPV mucosali e cutanei (Munger et al., 2004). All'interno di ciascuno gruppo, gli HPV vengono suddivisi in "a basso rischio" o "ad alto rischio", in base al grado di progressione maligna delle lesioni a cui sono associati (Munger et al., 2004). La maggior parte degli HPV sono "a basso rischio" e causano lesioni benigne localizzate che, anche se non trattate, non vanno incontro a trasformazione neoplastica. Al contrario, gli HPV "ad alto rischio" sono associati frequentemente con lo sviluppo di lesioni maligne.

Tra gli HPV di tipo cutaneo, HPV-5 e HPV-8 sono classificati come "ad alto rischio", in quanto sono associati con lo sviluppo della epidermodisplasia verruciforme (EV), una patologia molto rara della pelle che ha fornito le prime indicazioni sul contributo degli HPV alla tumorigenesi umana (Pass et al., 1977).

Gli HPV di tipo mucosale a basso rischio, come HPV-6 e HPV-11, provocano verruche genitali (condilomi acuminati) (Munger et al., 2004). Gli HPV mucosali ad alto rischio causano, invece, lesioni intraepiteliali squamose che possono progredire in carcinoma cellulare squamoso di tipo invasivo (Munger et al., 2004). In particolare, alcuni tipi di HPV rappresentano gli agenti eziologici del cancro della cervice uterina, dal momento che circa il 99% di questi tumori risulta positivo per la presenza di DNA di HPV ad alto rischio (Walboomers et al., 1999). HPV-16 rappresenta il sierotipo mucosale ad alto rischio prevalente, seguito da HPV-18, da HPV-31 ed altri (zur Hausen, 2002).

Il cancro cervicale rappresenta uno dei tumori più diffusi nel mondo, con circa 470.000 nuovi casi diagnosticati ogni anno, ed è una delle principali cause di morte per cancro nelle donne (Parkin et al., 2001; Pisani et al.,

2002). L'infezione del tratto genitale da parte degli HPV ad alto rischio può causare inizialmente delle lesioni di basso grado, indicate come displasia o neoplasia cervicale intraepiteliale (CIN) di grado I, che rappresentano le lesioni precursori del cancro cervicale (Hopfl et al., 2000). Tali lesioni presentano un differenziamento cellulare alterato e vengono di norma "riparate" dal sistema immunitario in meno di un anno (Jenson et al., 1991). Alcune di queste lesioni resistono al sistema immunitario e si mantengono per lunghi periodi, anche decenni. E' generalmente accettato che la persistenza di un'infezione da parte degli HPV ad alto rischio rappresenta il fattore di rischio principale per lo sviluppo del cancro cervicale (zur Hausen, 1996).

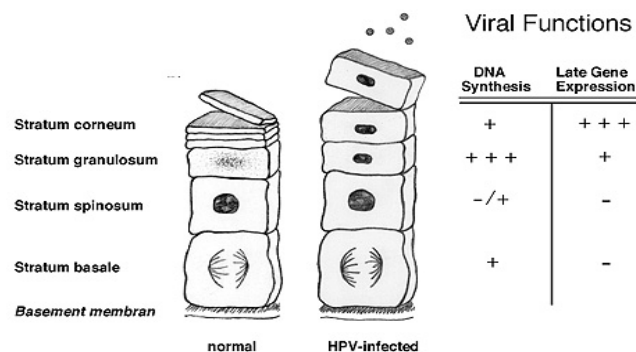
### **1.1.2 Il ciclo biologico degli HPV**

Il ciclo vitale produttivo dei Papillomavirus è strettamente connesso al programma di differenziamento della cellula epiteliale ospite infettata, il cheratinocita. Ogni strato dell'epidermide rappresenta una fase differente del programma di differenziamento terminale del cheratinocita. Ad ogni stadio di tale programma troviamo una precisa fase del ciclo vitale del virus. La progressione dell'infezione virale è, quindi, funzione del programma di differenziamento delle cellule epiteliali squamose.

La pelle è formata da vari strati. Lo strato più esterno, chiamato epitelio stratificato squamoso (o epidermide), è composto principalmente da cheratinociti che formano 4 strati morfologicamente distinti: germinativo, spinoso, granulare e corneo.

Come mostrato in figura 1, lo strato germinativo è indicato come strato basale, poi, andando verso la zona più superficiale dell'epidermide, seguono quello spinoso, granulare e, infine, lo strato corneo.

Per poter stabilire con successo un'infezione persistente, il virus deve raggiungere, attraverso piccole ferite o abrasioni superficiali della mucosa dell'ospite, le cellule dello strato epiteliale basale (chiamate cheratinociti basali). Questo tipo di cellule sono caratterizzate da una spiccata attività proliferativa e sono, quindi, in grado di permettere la persistenza del virus. L'HPV penetra all'interno della cellula ospite dove permane in fase latente oppure può andare incontro a replicazione attiva portando alla sintesi di virus infettivi. Il periodo di incubazione (periodo che intercorre dall'infezione alla manifestazione delle lesioni cliniche) varia da pochi mesi ad oltre 2 anni. Comunque, molti individui possono rimanere per tutta la vita portatori sani del virus senza produrre mai lesioni cliniche apparenti. L'infezione viene identificata quando si riscontra il DNA del virus nello strato basale dell'epidermide, anche se, in tale stadio, non è patologicamente manifesta (non provoca lesioni clinicamente apprezzabili). La transizione dall'infezione virale latente alla fase vegetativa è correlata al processo di differenziamento che le cellule epiteliali subiscono durante la migrazione verso gli strati cellulari più superficiali. Dopo l'iniziale fase proliferativa, i cheratinociti basali entrano nella fase post-mitotica del loro ciclo, iniziano a differenziare e migrare verso lo strato spinoso e granulare e assumono una forma non vitale nello strato corneo (fig. 1).



**Fig. 1. Organizzazione dell'epitelio in relazione all'infezione virale.**



La differenziazione squamosa è un processo che porta ad un cambiamento, finemente regolato e coordinato, dell'espressione genica che include l'induzione di alcuni geni, quali quelli delle cheratine, e la repressione di altri, ad esempio i geni legati alla progressione del ciclo cellulare.

Per assicurare la replicazione e il completamento del ciclo virale anche in queste cellule, gli HPV hanno sviluppato strategie per sovvertire il normale pathway della regolazione del ciclo cellulare della cellula infettata e hanno elaborato un sistema per disaccoppiare la proliferazione dal differenziamento cellulare (si veda paragrafo 1.1.5).

La replicazione del DNA degli HPV avviene attraverso due diversi meccanismi che dipendono dallo stato di differenziamento della cellula ospite: 1) replicazione plasmidica e 2) replicazione vegetativa.

Il primo si verifica nelle cellule proliferanti dello strato basale dell'epitelio. In queste cellule il DNA virale viene mantenuto stabilmente in forma episomale a copie multiple e si replica contemporaneamente al DNA cellulare (una volta per ciclo cellulare), venendo così trasmesso alle cellule figlie ad ogni divisione cellulare. In questa fase vengono espressi solamente i geni precoci del virus (E1, E2, E3, E4, E5, E6 e E7). A causa delle dimensioni ridotte del loro genoma (vedi paragrafo 1.1.3), questi virus non possono codificare la maggior parte degli enzimi necessari per la replicazione del loro DNA e di conseguenza utilizzano strutture e componenti cellulari dell'ospite. Questo tipo di replicazione assicura l'instaurarsi di un'infezione del virus persistente nelle cellule basali dell'epidermide.

La replicazione vegetativa del virus, invece, avviene nelle cellule degli strati superiori dell'epitelio (strato granuloso). Queste cellule si trovano ad uno stadio di differenziamento avanzato e non si ha più la sintesi del DNA cellulare. Paradossalmente, si osserva ugualmente un'intensa replicazione del DNA virale (cioè si formano i DNA che verranno poi racchiusi nei capsidi della progenie virale), l'attivazione dell'espressione dei geni virali

tardivi, la sintesi di proteine capsidiche e l'assemblaggio dei virioni. La formazione della progenie virale completa è presente solo nello strato più esterno dell'epitelio (strato corneo) e i virus assemblati sono espulsi nell'ambiente esterno quando le cellule epiteliali si desquamano. Di conseguenza il virus è trasmesso principalmente attraverso contatto diretto.

Il ciclo biologico degli HPV ad alto e basso rischio differisce in modo significativo. L'infezione e la conseguente lesione provocata da parte di questi due tipi di HPV dipende dal comportamento del genoma virale all'interno della cellula infettata. Il genoma di HPV può esistere in due stati differenti: come episoma o integrato nel genoma dell'ospite. La forma episomiale del virus, che è associata con la fase di latenza (caratterizzata da 1-2 copie del genoma virale per cellula) o con la fase vegetativa (caratterizzata invece da 100-300 copie), è stata osservata nelle lesioni a basso grado o nelle lesioni della neoplasia intraepiteliale premaligna (CIN). Il mantenimento del genoma in forma episomiale è una fase critica del ciclo vitale di HPV e dell'infezione persistente. Al contrario, la forma integrata nel genoma ospite, in singola copia o in strutture multicopie ripetute in tandem, è osservata nelle lesioni ad alto grado e nel carcinoma cervicale invasivo. Tale integrazione, riscontrabile solo nel caso di HPV ad alto rischio, determina un'interruzione del ciclo di crescita del virus e implica la distruzione di una parte del genoma virale e alterazioni geniche cellulari. In particolare, nel genoma virale si ha la perdita della regione genica compresa tra i geni E1 ed E2 con conseguente mancata trascrizione dei geni tardivi (codificanti per le proteine strutturali) e trascrizione incontrollata dei geni precoci E6 ed E7.

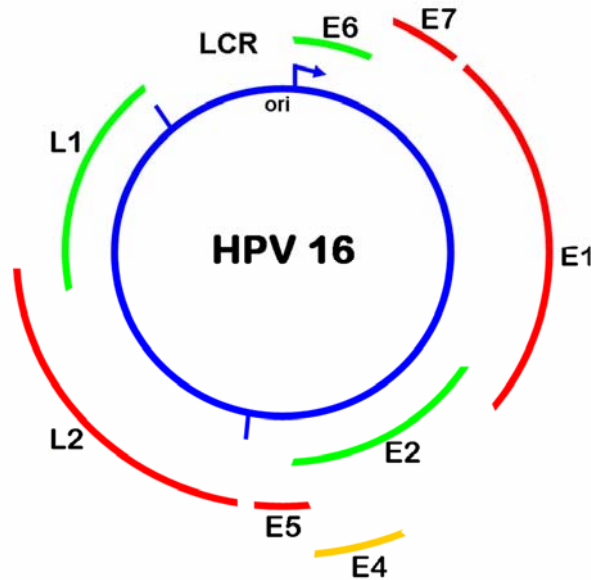
### 1.1.3 Il genoma di HPV

I Papillomavirus umani (HPV) sono piccoli virus privi di involucro esterno, con un capsido icosaedrico di 55 nm di diametro, a simmetria apparentemente sferica, privo di rivestimento lipoproteico e formato dal ripetersi di due proteine strutturali (L1 e L2). Il virione contiene un genoma costituito da DNA a doppio filamento circolare delle dimensioni di circa 8000 paia di basi (De Villiers et al. 2004). Tale genoma viene replicato all'interno del nucleo delle cellule ospiti infettate (Longworth and Laimins, 2004b) ed è stato trovato associato con gli istoni cellulari, a formare complessi simili alla cromatina (Howley, 1996).

Il genoma di tutti i tipi di HPV contiene otto “open reading frames” (ORF) che vengono trascritti come messaggeri policistronici utilizzando come stampo sempre lo stesso filamento di DNA (Fehrmann and Laimins, 2003). Il genoma può essere suddiviso in tre parti: una regione precoce (“early”, E) della lunghezza di circa 4 kb, codificante per le proteine non strutturali (E1, E2, E4, E5, E6 ed E7), una regione tardiva (“late”, L) di circa 3 kb, codificante per le due proteine del capsido (L1 e L2) e una regione di controllo non codificante (LCR) di circa 1 kb, posizionata tra i geni L1 ed E6, contenente sequenze *cis-agenti* che regolano la replicazione e l'espressione virali (fig. 2).

Negli HPV ad alto rischio la trascrizione inizia a partire da due promotori virali, uno precoce e uno tardivo. Il promotore precoce si trova a monte dell'ORF per la proteina E6, codifica per le proteine virali precoci ed è espresso prima della replicazione produttiva (Longworth and Laimins, 2004b). In concomitanza con l'induzione della replicazione e della sintesi di nuovi virioni, viene attivato un promotore tardivo che consente l'espressione delle proteine tardive da una serie di siti eterogenei situati vicino al nucleotide 742 (P<sub>742</sub>) in HPV-31 (Hummel et al., 1992). Promotori

simili sono stati identificati anche in HPV-16 e in HPV-18 (Frattini et al., 1997; Grassman et al., 1996).



**Fig. 2: Organizzazione del genoma di HPV-16.**

#### **1.1.4 Le proteine E1, E2, E4 ed E5**

La proteina E1 ha una dimensione di circa 68 kDa e viene espressa a bassi livelli nelle cellule HPV-positive. La sua funzione è di riconoscere e legare l'origine di replicazione in quanto mostra un'attività ATPasica ed elicasica 3'-5' (Hughes and Romanos, 1993; Seo et al., 1993; Yang et al., 1993). E1 riconosce le sequenze ricche di AT delle origini di replicazione degli HPV che sono localizzate in prossimità del promotore precoce (Frattini and Laimins, 1994; Muller et al., 1997). La proteina E1 mostra

un'iniziale bassa specificità di legame con tali sequenze; tale legame viene rafforzato dalla formazione di un complesso con la proteina E2 (Frattini and Laimins, 1994; Dixon et al., 2000; Lu et al., 1993). I siti di legame di E2 sono adiacenti alle sequenze di riconoscimento di E1. E2 consente il corretto posizionamento di E1 sul sito di origine. Una volta legate al sito attraverso l'azione di E2, le proteine E1 formano esameri che presentano un'alta affinità per il DNA (Sedman and Stenlund, 1998).

Le proteine E1 sono in grado di legare l'enzima DNA polimerasi  $\alpha$  della cellula ospite e di indurre il reclutamento dei complessi di replicazione cellulari nell'origine di replicazione virale (Conger et al., 1999; Masterson et al., 1998).

La proteina E2, di circa 50 kDa, regola sia la replicazione del DNA virale che la trascrizione dei geni virali (Laimins, 1998). E2 è attiva solamente in forma dimerica. Tali dimeri legano sequenze consensus palindromiche (ACCN6GGT), denominate siti di legame per E2 (E2BS) (Laimins, 1998). Tre di questi siti fiancheggiano le sequenze di riconoscimento di E1 nell'origine di replicazione (Howley, 1996).

Nel corso dell'infezione, la trascrizione dei geni precoci è regolata principalmente da fattori di trascrizione cellulari, quali TFIID e Sp1, che si legano a sequenze nella regione regolatoria virale (Steger and Corbach, 1997). In particolare, TFIID e Sp1 si legano alle sequenze E2BS presenti nel promotore precoce del genoma virale e attivano la trascrizione dei geni precoci, tra i quali E2. Espressa ad alti livelli, E2 reprime la propria trascrizione mediante un meccanismo di feedback negativo, in quanto si instaura una competizione di legame per le sequenze E2BS tra E2 e i fattori di trascrizione cellulari (Demeret et al., 1997). Questa regolazione dell'espressione virale consente di monitorare e controllare il numero di copie virali nelle cellule indifferenziate. Nel corso del differenziamento cellulare viene, invece, attivato il promotore tardivo del genoma virale, che non è sotto il controllo di E2. Il conseguente aumento dell'espressione di E1

e E2 porta all'amplificazione del numero di molecole di DNA virale (Klump and Laimins, 1999).

Le proteine E4 ed E5 vengono sintetizzate principalmente nelle fasi tardive del ciclo vitale del virus. E4 rappresenta la proteina maggiormente espressa tra tutte le proteine degli HPV (Howley, 1996). Il gene E4 è contenuto interamente all'interno della sequenza del gene E2 con una diversa fase di lettura. Si ritiene che la proteina E4 svolga una funzione di sostegno del citoscheletro cellulare durante la fase produttiva del ciclo virale: infatti, la ridotta disponibilità di proteine cellulari strutturali rischia di causare il collasso cellulare (Doorbar et al., 1991). Dati recenti indicano un coinvolgimento di E4 nei processi di regolazione virale basati sulla cooperazione di tale proteina con altre proteine virali (Roberts, 2006).

La proteina E5 degli HPV è una piccola proteina idrofobica (16 kDa) le cui funzioni non sono del tutto note. È localizzata nelle membrane endosomiali, nell'apparato del Golgi e, meno frequentemente, a livello delle membrane cellulari (Conrad et al., 1993). Nei Papillomavirus dei bovini (BPV), E5 rappresenta la principale proteina con attività trasformante. Si associa con le membrane intracellulari e trasforma le cellule attivando recettori tirosin-chinasici, come il recettore  $\beta$  per il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), attraverso un meccanismo indipendente dal ligando (DiMaio and Mattoon, 2001). La proteina E5 degli HPV presenta una certa omologia con la sua controparte dei BVP, ma interagisce con diversi bersagli cellulari. Evidenze sperimentali suggeriscono che E5 sia in grado di interagire con la subunità 16k pompa protonica (V-ATPasi) lisosomiale bloccandone l'attività con conseguente alcalinizzazione del lisosoma. Tale fenomeno può determinare la mancata degradazione lisosomiale del recettore per l'EGF (fattore di crescita epidermico) e di conseguenza una continua attivazione del pathway dell'EGF (DiMaio and Mattoon, 2001). Nonostante la mancata espressione di E5 alteri il ciclo vitale degli HPV ad alto rischio (Fehrman et al., 2003), l'espressione di tale proteina non è generalmente rilevata nei

cancro cervicali caratterizzati dall'integrazione del genoma virale. Tale osservazione suggerisce che E5 non sia necessaria per il mantenimento del fenotipo trasformato.

### **1.1.5 La proteina E6**

La proteina E6 di tutti gli HPV è costituita da circa 151 aminoacidi e presenta due domini zinc-finger con i motivi Cys-X-X-Cys. E6 è uno dei principali oncogeni del virus e viene espressa precocemente nel corso del ciclo virale. Può causare immortalizzazione cellulare e, con l'ausilio di E7, può condurre alla trasformazione cellulare. Studi *in vivo* e *in vitro* hanno mostrato che E6 induce importanti cambiamenti nella cellula ospite quali iperproliferazione delle cellule epiteliali, una parziale inversione del processo di differenziamento negli strati epiteliali, formazione di tumori benigni e maligni. Inoltre, l'interazione di E6 con diversi fattori cellulari durante il ciclo virale può inibire l'attivazione del programma apoptotico cellulare, alterare il macchinario di trascrizione cellulare, interferire nell'interazione cellula-cellula e aumentare il "life-span" della cellula.

La principale azione anti-apoptotica del virus viene esplicata attraverso il legame di E6 con la proteina cellulare p53, noto regolatore del processo apoptotico. E6 si lega a p53 attraverso un complesso ternario con una ligasi-ubiquitina, E6AP (Huibregtse et al., 1991). Tale complesso induce l'ubiquitinazione e la degradazione di p53 mediante il proteosoma 26S. Ciò porta a una riduzione della vita media di p53 che passa da alcune ore a meno di 20 minuti nei cheratinociti infettati (Haubbert et al., 1992).

E6 è in grado di regolare negativamente l'attività di p53 anche in modo indiretto, attraverso la sua associazione con p300/CBP, un coattivatore di p53 (Zimmermann et al., 1999).

Questo rapido turnover di p53, proteina fondamentale nella regolazione dei “checkpoint” del ciclo cellulare nelle transizioni fra le fasi G<sub>1</sub>/S e G<sub>2</sub>/M, ha come risultato l’alterazione di questi controlli, portando a duplicazioni cromosomiche e anomalie centrosomali (Thompson et al., 1997). E6 è in grado di inibire l’apoptosi anche attraverso un pathway p53-indipendente, caratterizzato dall’interazione di E6 con Bak, un membro pro-apoptotico della famiglia Bcl-2. Quest’interazione causa la degradazione ubiquitina-dipendente di Bak, attraverso il reclutamento della ligasi ubiquitina E6-AP. Inoltre, è stato dimostrato che la proteina E6 è in grado di interagire e causare la degradazione ubiquitina-dipendente di FADD (“Fas-Associated Death Domain”), una proteina importante per l’innesco del processo apoptotico estrinseco (Filippova et al., 2004).

La proteina E6 dei ceppi ad alto rischio è in grado di attivare l’espressione della subunità catalitica della telomerasi, hTERT (Klingelutz et al., 1996). La telomerasi è un enzima a quattro subunità che aggiunge nucleotidi alle estremità telomeriche dei cromosomi. L’attività della telomerasi è ristretta di solito alle cellule embrionali, mentre è assente o molto ridotta nelle cellule somatiche. La mancanza di una cospicua attività di questo enzima produce un accorciamento progressivo dei telomeri nel corso delle divisioni cellulari con induzione finale della senescenza (Liu et al., 1999). Nella maggior parte dei tumori si verifica la riattivazione dell’espressione di hTERT che porta alla ricostituzione dell’attività della telomerasi e conseguente (Liu et al., 1999). E6 sembra attivare la trascrizione di hTERT attraverso l’azione combinata di Myc e Sp-1 (Greenberg et al., 1989).



### 1.1.6 La proteina E7

La proteina E7 è stato il primo oncogene degli HPV ad essere scoperto ed è la principale responsabile dell'attività trasformante degli HPV ad alto rischio. Le proteine E7 di tutti gli HPV sono piccoli polipeptidi acidi di 98 aminoacidi e sono attive in forma dimerica. Il basso livello cellulare di E7 riscontrato è una conseguenza della sua vita media relativamente corta (meno di 2h) (Smotkin and Wettstein, 1987). La struttura della proteina E7 è caratterizzata da tre regioni conservate, indicate come CR1 (aa 1-15), CR2 (aa 16-37) e CR3 (aa 38-98), basate su l'omologia di sequenza con la proteina E1A di Adenovirus (fig. 3). L'estremità amino-terminale di E7 contiene una regione di 37 aminoacidi che presenta un'elevata omologia di sequenza con una piccola porzione della regione conservata 1 (CR1) e con l'intera regione conservata 2 (CR2) della proteina E1A di Adenovirus (Ad) e con le sequenze corrispondenti degli antigeni tumorali "large" (T Ag) dei Poliomavirus, incluso SV40 (Phelps et al., 1988).



**Fig. 3. Rappresentazione schematica dei domini funzionali di E7.**

La porzione carbossi-terminale non presenta una significativa omologia di sequenza con le corrispondenti regioni in E1A o SV40, nonostante condivida con tali proteine due domini zinc-finger Cys-X-X-Cys coinvolti nei processi di dimerizzazione della proteina (Clemens et al., 1995; McIntyre et al., 1993) e nell'interazione con molte proteine cellulari dell'ospite.

Il principale target intracellulare legato da E7 è la proteina del retinoblastoma, pRb. Le sequenze della regione CR1 sono necessarie per la trasformazione cellulare in quanto causano la degradazione di pRb, anche se non contribuiscono direttamente al legame di pRb. L'importanza di questa regione è stata dimostrata con esperimenti di mutagenesi mirata che aboliscono molte delle proprietà biologiche della proteina, senza interferire con la sua capacità di legare pRb (Brokaw et al., 1994; Phelps et al., 1992).

La regione CR2 contiene il dominio di legame a pRb, con il motivo centrale LXCXE (Dyson et al., 1989) (fig. 3), necessario per la trasformazione cellulare, e la sequenza consenso per la casein chinasi II (CKII).

Le proteine E7 degli HPV non presentano alcuna attività enzimatica intrinseca conosciuta. Sono delle fosfoproteine (Smotkin and Wettstein, 1987) e contengono due siti consenso, gli aminoacidi serina 31 e 32 della porzione amino-terminale, per la fosforilazione da parte della casein chinasi II (CKII) (Barbosa et al., 1990). E' stato descritto un sito addizionale di fosforilazione all'estremità carbossi-terminale, ma non è nota la proteina chinasi deputata a tale modificazione post-traduzionale (Massimi and Banks, 2000).

Studi di immunofluorescenza hanno dimostrato che le proteine E7 degli HPV sono anche nucleari (Greenfield et al., 1991). La sequenza di E7 non presenta la tipica sequenza di internalizzazione nucleare e il meccanismo di importo nucleare di queste proteine non è stato delucidato. Sono state descritte un certo numero di proteine cellulari non nucleari in grado di interagire con E7, facendo supporre che, almeno in certe condizioni, una

frazione di E7 possa risiedere nel citoplasma (Smotkin and Wettstein, 1987). In alcuni tipi cellulari E7 è stata rilevata anche in strutture nucleolari (Zatsepina et al., 1997).

Come accennato nel paragrafo 1.1.2, gli HPV, ma anche gli Adenovirus e i Poliomavirus come SV40, per poter replicare il loro genoma necessitano del macchinario per la replicazione del DNA della cellula ospite. Naturalmente tale macchinario è disponibile solo durante la fase S del ciclo cellulare e, quindi, risulta attivo solo in cellule proliferanti. Poiché questi virus si replicano anche in cellule non proliferanti, quali quelle differenziate degli strati superficiali dell'epidermide, ne consegue che il virus deve essere in grado di stimolare cellule, programmate a differenziare, a rientrare nel ciclo cellulare e progredire nella fase S. Una conseguenza di questa prolungata stimolazione è la mancata entrata nella fase di senescenza della cellula e, conseguentemente, l'immortalizzazione cellulare, come osservato in cheratinociti primari in coltura infettati da alcuni tipi di HPV. Di conseguenza, il completamento del ciclo virale e un'efficace replicazione riproduttiva virale dipende dalla capacità del virus di forzare la cellula ospite ad entrare nuovamente nella fase S anche in presenza di segnali anti-proliferativi. Questa sembra essere la principale funzione della proteina E7, interferendo nell'attività della proteina del retinoblastoma (pRb), nota per avere un'attività soppressiva della crescita cellulare e dello sviluppo di tumori (oncosoppressore).

I segnali che inducono il differenziamento, la privazione di fattori di crescita, l'inibizione da contatto, il danno al DNA o altre condizioni che provocano l'arresto della crescita confluiscono nel pathway delle proteine della famiglia RB. Il risultato è l'arresto della cellula nella fase G1 o, in alcuni casi, l'uscita dal ciclo cellulare e l'ingresso in G0 (stato di quiescenza). Studi biochimici mostrano che E7 si associa con le proteine della famiglia RB (pRb, p107, p130), con le istone deacetilasi (HDAC), con i fattori di trascrizione AP-1, con le proteine TBP (proteine leganti il

TATA-box), con le cicline, con le chinasi dipendenti dalle cicline (Cdk), con gli inibitori delle Cdk (Icdk) (Munger et al., 2004). Tali associazioni rappresentano alcune delle probabili vie attraverso le quali E7 perturba il ciclo cellulare causando un aumento della proliferazione, l'immortalizzazione e la trasformazione della cellula infettata (Munger et al., 2004).

Le proteine della famiglia RB, dette anche “pocket proteins” (pRb, p107 e p130), giocano un ruolo centrale nella regolazione del ciclo cellulare eucariotico (Dyson et al., 1998). Nella forma attiva, regolano negativamente il ciclo inibendo l'entrata della cellula nella fase S (Dyson et al., 1998). Sono chiamate proteine “pocket” per la presenza nella struttura tridimensionale di una “tasca” di legame conservata attraverso la quale legano fattori cellulari, come i fattori di trascrizione della famiglia E2F (Dyson et al., 1998). Le oncoproteine virali, tra le quali E7, riconoscono e si legano a tale dominio. I membri della famiglia E2F solitamente eterodimerizzano con un partner di legame (i membri della famiglia DP) formando un attivatore trascrizionale di geni coinvolti nella progressione del ciclo cellulare, quali le cicline A ed E, nella sintesi del DNA, quali la DNA polimerasi  $\alpha$  e la timidina chinasi, nell'apoptosi ed in altri processi cellulari (Cam et al., 2003). La proteina pRb interagisce con E2F1, E2F2 e E2F3 inibendo la loro funzione (Dyson et al., 1998). Oltre a legarsi al dominio di attivazione trascrizionale dei fattori E2F, pRb recluta anche fattori di rimodellamento della cromatina, come ad esempio la istone deacetilasi 1 (HDAC-1), per reprimere ulteriormente la trascrizione dipendente da E2F (Brehm et al., 1998).

Il livello di espressione dei membri della famiglia pRb differisce durante la transizione delle fasi G0/G1/S del ciclo cellulare. In particolare, pRb è espresso costitutivamente attraverso tutte le fasi del ciclo cellulare, p107 viene sintetizzato prevalentemente durante la fase S mentre p130 è prevalente nella fase G0. Questa osservazione suggerisce che le proteine

“pocket” possano regolare vari geni target di E2F a differenti tempi durante la transizione delle fasi G0/G1/S (Classon and Dyson, 2001).

La regolazione di pRb mediante fosforilazione è la più nota: nella fase G1 precoce pRb, nelle sue forme ipofosforilate, può legarsi ai fattori di trascrizione E2F e impedire a quest'ultimo di attivarsi attraverso la dimerizzazione con DP. In tal modo pRb riesce a reprimere efficacemente la trascrizione dei geni controllati da E2F. In seguito a stimoli proliferativi, nel corso della progressione della cellula dalla fase G1 a quella S del ciclo cellulare, pRb viene progressivamente iperfosforilato dai complessi ciclina-chinasi, provocando il rilascio della proteina dal legame col fattore E2F, il quale può così attivare la trascrizione dei geni coinvolti nella sintesi del DNA e nella progressione del ciclo cellulare (Dyson et al., 1998).

Lo scopo principale dell'inattivazione della famiglia RB da parte delle oncoproteine virali, quali E7, è quello di attivare la trascrizione dei geni regolatori del ciclo cellulare e della sintesi del DNA controllati da E2F, in modo da stabilire un ambiente permissivo per la replicazione virale (Helt and Galloway, 2003).

La regione CR2 di E7 si lega a pRb e agli altri membri della famiglia RB (p107 e p130) attraverso il motivo di sequenza LXCXE. E7 di HPV-16 si lega preferenzialmente alle forme ipofosforilate di pRb, specifiche delle fasi G0/G1 (Dyson et al., 1992). Legando pRb nello stato ipofosforilato, E7 sequestra la proteina dal legame con i complessi dimerici E2F/DP1, col risultato di un'attivazione costitutiva dei geni controllati da E2F/DP1. Come accennato prima, l'abolizione della funzione di pRb promuove la progressione del ciclo cellulare nelle cellule epiteliali differenziate, consentendo la fase di replicazione produttiva dei geni HPV (Chellappan et al., 1992). Coerentemente con questo modello, una mutazione nel dominio LXCXE di E7 impedisce il completamento del ciclo vitale degli HPV e annulla la sua attività trasformante (Flores et al., 2000). Oltre al dominio LXCXE, la capacità delle proteine E7 degli HPV ad alto rischio di

destabilizzare le "pocket proteins" richiede la presenza di altre sequenze all'interno del dominio CR1: infatti, mutazioni in tale dominio ne annullano la sua funzione trasformante. Di conseguenza, la capacità delle proteine E7 degli HPV ad alto rischio di destabilizzare le proteine "pocket" è critica per la trasformazione cellulare (Helt and Gallaway, 2001; Jones and Munger, 1997).

Dati sperimentali indicano che E7 è in grado di destabilizzare pRb promuovendo la sua proteolisi attraverso un meccanismo di ubiquitinazione e degradazione proteosomale (Boyer et al., 1996). La trasformazione cellulare ad opera di E7 sembra essere strettamente correlata alla sua abilità di degradare pRb (Jones and Munger, 1997). Sembra che sia la degradazione di pRb, e non il legame a quest'ultima, necessario alla completa inattivazione della funzione di pRb (Gonzalez et al., 2001). Un ruolo nella funzione di E7 di HPV-16 (ceppo ad alto rischio) di distruggere il complesso pRb/E2F è attribuito anche a sequenze all'estremità carbossi-terminale di E7.

Le proteine E7 degli HPV a basso rischio hanno anch'esse la capacità di associarsi con pRb, ma con un'affinità molto ridotta rispetto al legame tra E7 degli HPV ad alto rischio e pRb. Le proteine E7 degli HPV ad alto e a basso rischio contengono aminoacidi simili, ma non identici, nel dominio CR2 che media il legame a pRb (Ciccolini et al., 1994). Un singolo cambiamento aminoacidico nel sito di legame di pRb delle proteine E7 degli HPV a basso rischio può portare ad una maggiore affinità di legame per pRb e all'acquisizione della capacità di trasformare cellule di roditore (Heck et al., 1992; Schmitt et al., 1994). Quindi la capacità di legare con affinità più o meno alta pRb è verosimilmente discriminante ai fini dell'oncogenicità di E7. Tuttavia, per esempio, la proteina E7 di HPV-1, un tipo virale associato con l'insorgenza di verruche plantari e quindi classificato come a basso rischio, lega i membri della famiglia RB con alta affinità, ma non è ugualmente in grado di attivare i geni inducibili da E2F o

di trasformare cellule di roditore (Heck et al., 1992; Schmitt et al., 1994). Tale proteina E7 non è in grado di degradare la proteina pRb e ciò contribuisce alla sua incapacità di attivare i geni regolati da E2F. Quindi, anche se il legame di pRb da parte di E7 è molto importante, altri fattori possono contribuire al ruolo di E7 nella trasformazione e immortalizzazione (Schmitt et al., 1994; Ciccolini et al., 1994).

E' interessante osservare che il dominio CR2, che contiene il sito di legame ad alta affinità per la proteina pRb, non è necessario per l'immortalizzazione dei cheratinociti umani primari infettati con l'interno genoma di HPV, suggerendo che l'interazione con pRb può essere dispensabile nel generare questo fenotipo (Jewers et al., 1992). Mutazioni nel motivo "zinc finger" nella regione CR3 di E7, invece, causano la completa perdita della capacità di immortalizzazione (Jewers et al., 1992). Da ciò consegue che l'inattivazione delle "pocket proteins" mediata da E7 non è sufficiente per giustificare la sua funzione di immortalizzazione e trasformazione cellulare. Queste osservazioni hanno indotto la ricerca di interazioni, indipendenti da pRb, che coinvolgano E7 ed altri fattori cellulari e che potrebbero risultare altrettanto necessarie ed essenziali per l'immortalizzazione cellulare (McMurray et al., 2000).

Come descritto all'inizio di questo paragrafo, l'oncoproteina E7 degli HPV ad alto rischio presenta, oltre a pRb, altri target cellulari che sono rilevanti per la trasformazione cellulare. Le proteine E7 possono associarsi con le cicline A e E e con gli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti (Cdk), p21<sup>CIP</sup> e p27<sup>KIP1</sup>. Dal momento che i complessi ciclica/chinasi guidano la progressione del ciclo cellulare fosforilando la proteina pRb, non sorprende che la proteina E7 agisca incrementando l'attività di queste proteine. Le proteine E7 degli HPV ad alto rischio legano direttamente i complessi ciclina A/Cdk2 mantenendo alta la loro attività chinastica (McIntyre et al., 1996). Le proteine E7 degli HPV ad alto rischio agiscono anche incrementando i livelli delle proteine ciclina A e E, mentre le proteine E7

degli HPV a basso rischio non hanno tale effetto (Martin et al., 1998). Studi effettuati utilizzando la proteina E7 degli HPV ad alto rischio hanno dimostrato la capacità di questa proteina di sopprimere le attività degli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti (CKI), come p21<sup>CIP1</sup> (Funk et al., 1997; Jones et al., 1997) e p27<sup>KIP1</sup> (Zerfass-Thome et al., 1996). Dal momento che queste proteine rappresentano dei regolatori critici dell'arresto del ciclo cellulare durante il differenziamento dei cheratinociti (Missero et al., 1996), la loro inibizione da parte di E7 può contribuire al mantenimento di un ambiente cellulare competente alla replicazione virale nelle cellule epiteliali differenziate dell'ospite. Recentemente, è stato dimostrato che l'inattivazione sia della proteina pRb che di p21 è necessaria per prevenire l'arresto del ciclo cellulare (Cheng et al., 1995).

E7 sembra avere un effetto pleomorfo sui pathway apoptotici cellulari, dipendente dal tipo cellulare analizzato e dalla natura dello stimolo pro-apoptotico indotto (Finzer et al., 2002; Garnett and Duerksen-Hughes, 2006). In alcuni studi è stato osservato un ruolo anti-apoptotico da parte di E7 (Magal et al., 1998; Yuan et al., 2005; Severino et al., 2007) mentre in altri la cellula infettata è risultata più sensibile all'apoptosi (Stöppler et al., 1998; Thompson et al., 2001; Kaznelson et al., 2004; Simbulan-Rosenthal et al., 2006).

### **1.1.7 Meccanismi molecolari del ciclo vitale**

Il ciclo vitale dei Papillomavirus può essere schematizzato in tre stadi successivi: 1) l'entrata del virus nelle cellule dello strato basale dell'epidermide e la replicazione del genoma virale; 2) il mantenimento del suo genoma come episoma nelle cellule epiteliali basali e 3)



l'amplificazione del genoma, l'espressione dei geni tardivi e l'assemblaggio dei nuovi virioni nei cheratinociti differenziati.

Si ritiene che l'infezione da parte dei Papillomavirus si verifichi attraverso microtraumi nell'epitelio, che espongono le cellule dello strato basale all'ingresso dei virus. La specificità dei Papillomavirus nei confronti delle cellule epiteliali potrebbe far pensare all'esistenza di un recettore specifico, ma non sono stati ancora identificati né il recettore cellulare né alcun potenziale ligando specifico sul capside virale. Primi esperimenti attribuivano alle integrine  $\alpha 6$ - $\beta 4$  un ruolo chiave come recettori cellulari per l'entrata del virus (Sibbet et al 2000) ma, come è noto, queste proteine di membrana non si trovano esclusivamente nelle cellule epiteliali. Un'ipotesi alternativa prevede che il virus penetri in modo aspecifico nelle cellule con cui viene a contatto e solo nelle cellule epiteliali trovi l'ambiente favorevole per il decorso del suo ciclo vitale.

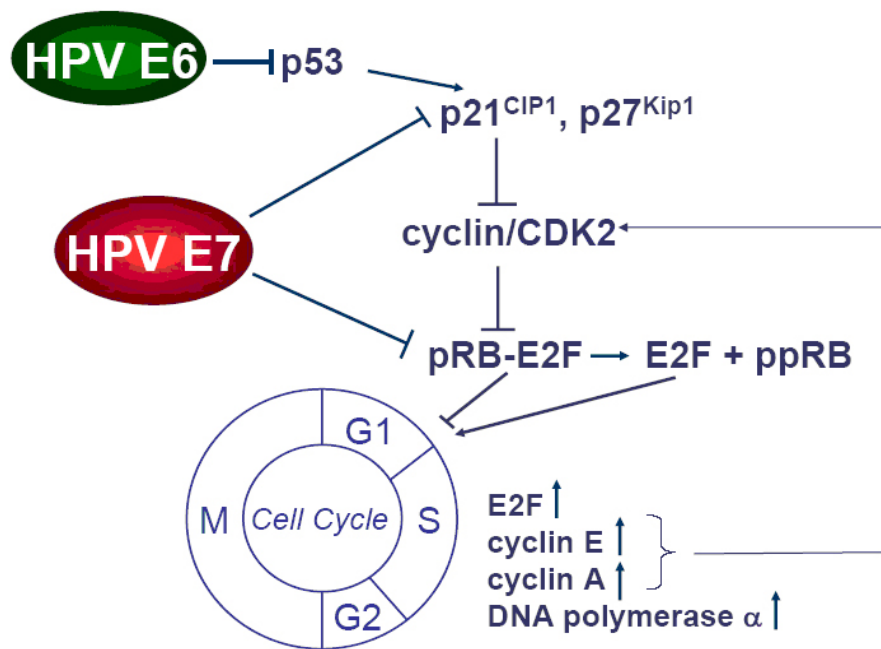
Una volta penetrato all'interno della cellula, probabilmente con un meccanismo di endocitosi, il genoma virale raggiunge il nucleo e viene mantenuto in forma episomale. Tale stato è associato con l'attivazione della trascrizione dei geni precoci virali e conseguente produzione delle proteine di replicazione E1 e E2, le prime ad essere espresse, e delle oncoproteine E5, E6 ed E7 (Fehrmann and Laimins, 2003). Come accennato nel paragrafo 1.1.2, la proteina E2 gioca un ruolo fondamentale nel regolare la trascrizione virale a partire dal promotore precoce (Laimins, 1998). Dal momento che i fattori di replicazione E1 e E2 sono espressi anch'essi a partire dal promotore precoce, la capacità di E2 di regolare espressione genica a livello del promotore precoce contribuisce al controllo del numero di copie virali nelle cellule indifferenziate. Nelle cellule destinate al rinnovamento dello strato basale della cute, il DNA virale viene replicato, sotto controllo cellulare, durante la fase S in sincronia con il genoma della cellula ospite (una volta per ciclo cellulare). In questo modo si assicura un'infezione persistente nelle cellule basali.

L'inizio e il processo di differenziamento cellulare in atto nei cheratinociti rappresenta un problema per il virus, dal momento che gli HPV non codificano, a parte E1 ed E2, gli altri enzimi e proteine necessarie per la replicazione del DNA. Di conseguenza la produzione dei genomi virali dipende criticamente dal macchinario di sintesi del DNA cellulare della cellula ospite che durante il differenziamento cessa di funzionare (Munger et al., 2001). Negli epiteli normali non infettati i cheratinociti escono dal ciclo cellulare non appena lasciano lo strato basale e si assiste alla perdita dei nuclei nelle cellule soprabasali. Le cellule terminalmente differenziate sono, quindi, intrinsecamente incompetenti a supportare la sintesi del genoma virale. Quindi il virus necessita di stimolare la progressione dalla fase G1 a quella S del ciclo cellulare a dispetto di una cellula programmata a differenziare terminalmente, in modo da produrre l'ambiente corretto per la replicazione virale (McMurray et al., 2000). Tuttavia, il virus richiede nello stesso tempo un certo livello di differenziamento cellulare per la replicazione e per l'assemblaggio delle particelle virali infettive, dal momento che il promotore tardivo, che regola gli mRNA che codificano per le proteine del capsido, viene attivato soltanto nelle cellule parzialmente differenziate.

I prodotti dei geni virali svolgono diversi compiti. La proteina E5, esaltando la risposta all'EGF e ad altri fattori di crescita, sottopone la cellula ad uno stimolo proliferativo. La proteina E6, tramite l'interazione con p53 e la successiva degradazione di quest'ultima, sopprime il blocco in G1 inibendo le attività di sorveglianza sull'integrità genomica e di attivazione della via apoptotica. La proteina E7, mediante l'interazione con pRb, rimuove l'inibizione della trascrizione di geni necessari per il ciclo cellulare promuovendo così la transizione G1/S (fig. 4). Di conseguenza, gli HPV codificano funzioni che creano e mantengono un ambiente cellulare competente alla replicazione anche nei cheratinociti differenziati (Munger et al., 2001). Quindi il virus esprime precocemente, negli strati basali e

soprabasali, proteine le cui attività tendono a stimolare la progressione dalla fase G1 a quella S (McMurray et al., 2000). Di conseguenza, le cellule infettate con gli HPV che hanno lasciato lo strato basale rimangono attive nel ciclo cellulare grazie all'azione concertata di tali proteine di HPV, con un ruolo essenziale svolto da E7 (Cheng et al., 1995). Tale ingresso nella fase S ha come risultato l'amplificazione dei genomi virali fino a migliaia di copie per cellula. La presenza della proteina E7 porta alla caratteristica ritenzione dei nuclei attraverso tutti gli strati degli epiteli infettati (Cheng et al., 1995). Il risultato finale è il disaccoppiamento della progressione della fase G1/S del ciclo cellulare dal differenziamento, col risultato di ottenere cellule in fase di differenziamento, ma con nuclei in piena fase S.

Contemporaneamente all'amplificazione del DNA virale vi è la sintesi delle proteine E1, E4 e delle proteine del capsido L1 ed L2, utilizzate per l'assemblaggio dei virioni infettivi. Nelle cellule terminalmente differenziate, il virus si replica producendo un alto numero di copie, vengono espressi i geni tardivi e viene prodotta la progenie virale (Fehrmann and Laimins, 2003). Successivamente, i virioni vengono rilasciati nell'ambiente mentre lo strato superiore dell'epitelio viene liberato (Fehrmann and Laimins, 2003). Gli HPV non sono virus litici, di conseguenza la progenie del virus viene diffusa nell'ambiente circostante come un "carrier" all'interno delle squame epiteliali. La proteina E4 degli HPV si associa con i filamenti intermedi di cheratina, il che può inficiare la stabilità meccanica della rete di cheratina facilitando così il rilascio delle particelle virali (Doorbar et al., 1991)



**Fig.4. Influenza delle proteine E6 ed E7 sul ciclo cellulare delle cellule infettate.**

### 1.1.8 Integrazione del DNA degli HPV nel genoma cellulare

Nelle lesioni cervicali di basso grado, i genomi degli HPV si trovano esclusivamente come molecole di DNA episomali. Nei carcinomi cervicali, invece, i genomi degli HPV ad alto rischio si trovano integrati nel DNA della cellula ospite.

Uno degli eventi chiave della carcinogenesi indotta da HPV è l'integrazione del genoma degli HPV nel cromosoma dell'ospite. Tale integrazione si verifica spesso nei pressi dei siti fragili che si trovano nel genoma umano

(Thorland et al., 2003), ma apparentemente non vi sono “hot-spot” per l’integrazione né evidenze per una mutagenesi di tipo inserzionale (Ziegert et al., 2003). L’integrazione ha come conseguenza uno stravolgimento dell’espressione genica virale e della presenza fisica del genoma virale integro. La presenza del DNA codificante i geni virali E6 ed E7 viene mantenuta, così come la loro espressione. Le rimanenti porzioni del DNA virale vengono spesso delete o la loro espressione viene regolata negativamente (Baker et al., 1987). La mancata produzione del repressore trascrizionale E2 degli HPV consente l’espressione deregolata delle proteine E6 ed E7, uno dei primi eventi che può portare a un fenotipo trasformato. La capacità di progressione carcinogenica delle infezioni da HPV ad alto rischio è attribuita principalmente alle azioni delle proteine E6 e E7, capaci di manipolare i regolatori principali del ciclo cellulare.

Dato che, come accennato nel paragrafo 1.1.1, il 99% dei tumori alla cervine uterina risulta positivo per la presenza di DNA di HPV ad alto rischio (Walboomers et al., 1999) e che l’integrazione del genoma porta al mantenimento dell’espressione genica virale solamente di E6 ed E7, ne consegue che queste due proteine giocano un ruolo chiave nell’indurre trasformazione maligna (Munger et al. 2004; Whiteside et al. 2008; McLaughlin-Drubin and Munger 2008).

Vi sono anche evidenze di un aumento della stabilità degli mRNA di E6 ed E7 di HPV-16 dopo l’integrazione (Jeon and Lambert, 1995) e sono state rilevate alterazioni specifiche dell’espressione genica cellulare dell’ospite in seguito all’integrazione del genoma degli HPV (Alazawi, 2002).

Dopo l’integrazione, la trascrizione virale può andare incontro a splicing alternativo con relativa produzione di due tipi di mRNA virale. Un trascritto ha il potenziale di codificare per le proteine E6 ed E7 canoniche, mentre un’altra serie di trascritti codifica per le proteine E6 ottenute mediante un processo di splicing alternativo (indicate come E6\*) e per E7 canonica. La maggior parte dei trascritti di HPV nelle cellule di cancro cervicale usano

segnali di splicing e di poliadenilazione cellulari, che porta a un aumento della stabilità dei trascritti virali.

Le cellule che esprimono E6 ed E7 da sequenze di HPV integrate presentano un vantaggio di crescita selettivo rispetto alle cellule con i genomi HPV episomali (Jeon et al., 1995).

L'ipotesi che la perdita della funzione di repressore di E2 possa risultare critica per la progressione maligna è supportata da esperimenti effettuati inserendo E2 esogeno in linee cellulari di cancro cervicale: si ha come risultato la soppressione della crescita (Thierry and Yaniv, 1987). Tali esperimenti dimostrano chiaramente che l'espressione continuata di E6 ed E7 nei tumori cervicali, possibile solo in assenza di E2, è necessaria per il mantenimento del fenotipo trasformato (Goodwin and DiMaio, 2000).

L'integrazione del genoma virale nel cromosoma della cellula ospite porta anche alla perdita dell'espressione della proteina E5, ma ciò non inficia la possibilità, da parte del virus, di immortalizzare e trasformare le cellule infettate, segno che tale proteina non è necessaria per il mantenimento del fenotipo trasformato nei tumori alla cervice.

## **1.2 Fattori cellulari che interagiscono con le oncoproteine di HPV**

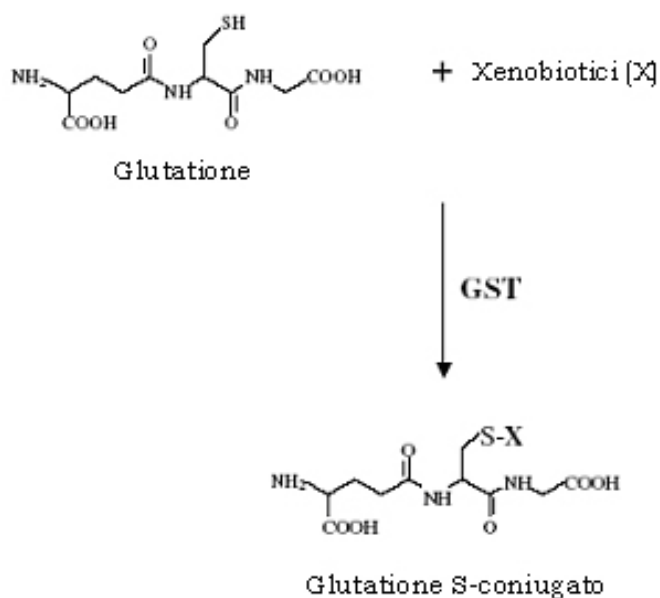
Molte delle funzioni biologiche svolte dalle oncoproteine di HPV all'interno della cellula derivano dalla loro capacità di interagire con fattori della cellula ospite, modificandone le caratteristiche funzionali. In particolare, la proteina E7 è in grado di interagire con numerose proteine della cellula infettata.

Nel laboratorio dove è stata svolta questa tesi ne sono state identificate alcune ed è stato studiato il significato funzionale e biologico dell'interazione. Si è visto che E7 interferisce con la funzione di questi fattori cellulari per conferire una resistenza all'apoptosi o indurre instabilità genomica nella cellula infettata. Tra questi fattori vi è Siva-1, un fattore cellulare pro-apoptotico (Severino et al., 2007); Nm23, un soppressore della metastasi (Mileo et al., 2006); Ran, regolatore del trasporto nucleocitoplasmatico e dell'organizzazione del fuso mitotico (De Luca et al., 2003); gelsolina, un enzima che regola la polimerizzazione dei filamenti di actina e ha anche un ruolo regolatorio dell'apoptosi.

Per identificare nuovi interattori cellulari sono state analizzate proteine di un lisato cellulare di cheratinociti umani immortalizzati (HaCaT) in grado di interagire con la proteina chimerica E7-HPV16. Questa linea cellulare è stata scelta perché i Papillomavirus mostrano un tropismo ristretto alle cellule del tessuto epiteliale (vedi paragrafo 1.1.1). Dopo separazione elettroforetica e successiva analisi mediante spettrometria di massa delle bande corrispondenti alle proteine cellulari che interagiscono con E7, è stato identificato un nuovo fattore cellulare in grado di legare E7: la proteina Glutathione S-Transferasi P1 (GSTP1). Questo legame è stato confermato attraverso esperimenti di co-precipitazione *in vitro* e *in vivo*.

### 1.2.1 La famiglia delle Glutathione S-Transferasi

Le glutathione S-transferasi (GST) costituiscono una superfamiglia di enzimi detossificanti di fase II, la cui funzione è quella di proteggere la cellula dall'attacco di elettrofili. Le GST sono in grado di trasformare i prodotti del metabolismo di fase I (composti idrofobici ed elettrofilici) in composti idrosolubili facilmente eliminabili dalla cellula tramite gli enzimi di fase III. In particolare le GST catalizzano l'addizione nucleofila del glutathione ridotto (GSH) a composti elettrofili di natura esogena, quali farmaci o inquinanti ambientali, ed endogena, quali prodotti dello stress ossidativo, entrambi dannosi per la cellula, contribuendo alla loro biotrasformazione e successiva eliminazione (Townsend and Tew, 2003) (fig. 5). Alcune GST sono in grado di catalizzare altre reazioni enzimatiche, quali la riduzione GSH-dipendente dei perossidi, l'isomerizzazione e la sintesi di eicosanoidi (Townsend and Tew, 2003).



**Fig. 5. Reazione enzimatica di addizione nucleofila catalizzata dalle GST presenti nella cellula.**



La superfamiglia delle GST si suddivide in tre principali famiglie ampiamente diffuse in natura, dotate di attività glutatione-S-transferasica: GST citosoliche, mitocondriali e microsomiali. Nell'ambito dei procarioti è presente un'altra famiglia di transferasi, rappresentata dalle proteine batteriche FosA e FosB, responsabili della resistenza alla fosfomicina (Armstrong et al., 2000). Le GST citosoliche e mitocondriali sono enzimi solubili che condividono una struttura tridimensionale simile nonostante la scarsa omologia di sequenza aminoacidica (Robinson et al., 2004; Ladner et al., 2004; Holm et al., 2002). Le GST citosoliche derivano da un comune gene ancestrale che nel tempo ha subito numerose mutazioni genetiche, quali duplicazioni e ricombinazioni (Townsend e Tew, 2003). La famiglia delle GST microsomiali si distingue dalle altre dal punto di vista strutturale ed è nota con la sigla MAPEG (Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism) (Holm et al., 2002; Ladner et al., 1999; Robinson et al., 2004). Gli enzimi MAPEG e alcune GST citosoliche catalizzano l'isomerizzazione di molti composti insaturi (Jakobsson et al., 1999; Dixon et al., 2000) e sono coinvolte nella sintesi delle prostaglandine e dei leucotrieni (Hayes and McLellan, 1999; Jakobsson et al., 1999).

La famiglia delle GST citosoliche rappresenta la famiglia più numerosa di transferasi ed è costituita da proteine caratterizzate da un elevato polimorfismo. Nell'uomo sono state identificate almeno 8 classi, denominate alpha, kappa, mu, omega, pi, sigma, theta, e zeta, distinte sulla base della loro sequenza aminoacidica, della specificità di substrato e delle proprietà immunologiche (Board et al., 2000).

Le più rappresentate sono le classi alpha, mu e pi, le quali sono cataliticamente attive in forma dimerica, sotto forma di omo o etero-dimeri (Ladner et al., 2004). A dispetto della bassa omologia di sequenza aminoacidica, le strutture tridimensionali delle GST citosoliche non differiscono in modo significativo. Ogni monomero contiene, infatti, un sito di legame molto conservato per il glutatione, denominato G-site e un altro

sito, denominato H-site, responsabile del legame con il substrato specifico. La selettività di legame a differenti substrati è garantita da differenze più o meno consistenti nel sito H (Armstrong, 1997).

Livelli variabili dell'espressione di alcune GST sono stati identificati come fattori di rischio nello sviluppo di alcune neoplasie (Strange and Fryer, 1999), nell'acquisizione di resistenza ai farmaci (Hayes and Pulford, 1995; O'Brien and Tew, 1996; Tew, 1994; Hall et al., 1994) e nell'insorgenza della malattia di Parkinson (Menegon et al., 1998).

Le GST sono di particolare interesse in ambito farmacologico e tossicologico in quanto rappresentano il bersaglio molecolare delle terapie antiasmatiche e antitumorali (Evans et al., 1991; Matsushita et al., 1998) e in quanto metabolizzano agenti chemioterapici, insetticidi, erbicidi, cancerogeni e prodotti dello stress ossidativo cellulare. L'esposizione ad agenti pro-ossidanti provoca un aumento dell'espressione delle GST in microbi, piante, insetti, pesci e mammiferi (Allocati et al., 2003; Veal et al., 2002; Leiers et al., 2003; Desikan et al., 2001; Wang et al., 2003).

I chemioterapici utilizzati nei trattamenti farmacologici antineoplastici rappresentano importanti substrati delle GST, le quali ne catalizzano la coniugazione con il glutathione e successiva espulsione dalla cellula attraverso specifiche pompe di esporto. Questo fenomeno, denominato "farmacoresistenza", si instaura in molti pazienti neoplastici e determina spesso il fallimento di molti trattamenti chemioterapici (Tew et al., 1996).

### **1.2.2 La proteina GSTP1 (Glutathione S-Transferasi di classe p)**

La GSTP1, di peso molecolare 23.5 kD, rappresenta l'enzima GST più abbondante nelle cellule epidermiche (Blacker et al., 1991).

Il gene della GSTP1, di circa 3Kb, è localizzato sul cromosoma 11 (11q13) (Cowell et al., 1988). Sono state identificate quattro forme polimorfiche attive e funzionalmente differenti della GSTP1 (GSTP1\*A-D) (Ali-Osman et al., 1997), il cui genotipo è stato associato a differenti risposte chemioterapiche ed alla propensione carcinogenica. Ogni isoforma è caratterizzata da mutazioni puntiformi nel sito attivo della proteina e può influenzare il tipo di substrato che l'enzima è in grado di detossificare (Ali-Osman et al., 1997). E' stata, inoltre, osservata la sua sovraespressione in un'ampia varietà di tumori, quali ovaio, polmone, seno, colon, pancreas e linfoma (Tew, 1994). Alcuni studi hanno dimostrato che il cancro alla prostata è l'unico esempio in cui l'assenza o la riduzione dell'espressione della GSTP1 è associata con l'incidenza del tumore, essendo molto espressa in tessuti di prostata normali e non riscontrabile in cellule maligne (Nelson et al., 2001).

Viceversa, in topi silenziati geneticamente per GSTP1 (GSTP1<sup>-/-</sup>) è stato osservato un significativo aumento dei tumori della pelle dopo esposizione a potenti carcinogeni (Henderson et al., 1998a).

L'elevato livello di espressione dell'enzima GSTP1 nelle cellule tumorali rappresenta una delle cause del fenomeno della "farmacoresistenza" (vedi paragrafo 1.2.1). Numerosi studi hanno dimostrato che l'aumento dell'espressione della GSTP1 nel tessuto tumorale è correlata con la progressione neoplastica e con la resistenza ai trattamenti anti-neoplastici e, quindi, può essere considerato un fattore prognostico negativo in molti tipi di tumore (Henderson et al., 1998b; Dang et al., 2005; McIlwain et al., 2006).

La proteina GSTP1, come le altre GST cellulari, risulta attiva cataliticamente in forma dimerica/multimerica, dove i monomeri si aggregano attraverso interazioni idrofobiche ed elettrostatiche. Ma la GSTP1 può andare incontro ad ossidazioni dei residui di cisteina (formazione di ponti disolfuro inter ed intramolecolari) con conseguente inattivazione dell'enzima (Ricci et al., 1991; Shen et al., 1991; Shen et al., 1993). È stato dimostrato, tramite mutazioni puntiformi, che i residui di cisteina nelle posizioni 14, 47, 101 e 169 sono i principali responsabili della formazione di ponti disolfuro con altre proteine GSTP1, con conseguente formazione di dimeri o multimeri (Shen et al., 1991; Shen et al., 1993). In particolare, il residuo di cisteina 47 è il gruppo tiolico più reattivo della GSTP1 (Lo Bello et al., 1990)

Sebbene questi residui di cisteina non siano coinvolti direttamente nella reazione enzimatica, la formazione di multimeri ossidati porta alla completa inattivazione dell'enzima GSTP1. Ad esempio, il residuo 47 non è direttamente coinvolto nel meccanismo catalitico dell'enzima, ma è essenziale per la corretta disposizione spaziale del G-site, uno dei due siti attivi dell'enzima (Ricci et al., 1996; Oakley et al., 1997; Bernardini et al., 2000). Di conseguenza una sua modificazione covalente causa la perdita dell'attività enzimatica della proteina (Tamai et al., 1990; Lo Bello et al., 1990; Ricci et al., 1991).

GSTP1 è inattivata anche quando si forma un ponte disolfuro intramolecolare tra i residui di cisteina 47 e 101; tale legame covalente porta ad un accumulo di GSTP1 monomerica allo stato ossidato (Ricci et al., 1991; Shen et al., 1993; Chang et al., 2001).

Data l'importanza dello stato redox della GSTP1 nell'attività dell'enzima è stato suggerito che tale enzima risenta e sia regolato dallo stato redox cellulare. Infatti, molti studi affermano che l'induzione di stress ossidativo cellulare, ad esempio attraverso trattamento con  $H_2O_2$  o con UV, causa

l'accumulo di multimeri/monomeri ossidati inattivi della GSTP1 (Shen et al., 1993; Bernardini et al., 2000; Cumming et al., 2001; Chang et al., 2001). Oltre al ben caratterizzato ruolo enzimatico, le GST di classe p e m hanno un ruolo determinante nella protezione cellulare da stress ossidativo o da danno genotossico inibendo la risposta pro-apoptotica mediata da ASK1/JNK (Apoptosis signal-regulating kinase) (c-Jun N-terminal kinase). Numerosi studi hanno dimostrato che le GST di classe p e m possiedono un ruolo regolatorio nel pathway delle MAP chinasi (Mitogen-Activated Protein kinase) (Adler et al., 1999; Yin et al., 2000; Xue et al., 2005). GSTM1 è stato identificato come un regolatore negativo di ASK1 e MEKK1, due proteine regolatrici del pathway delle MAP chinasi (Cho et al., 2001; Ryoo et al., 2004).

Anche la GSTP1 è in grado di inibire l'attivazione della cascata regolata da ASK1/JNK legando la proteina TRAF2 e inibendo così la sua interazione con ASK1 (Wu et al., 2006).

La proteina cruciale della cascata delle MAP chinasi è JNK1 (c-Jun N-terminal kinase), una chinasi coinvolta nella cascata di eventi molecolari che regola l'apoptosi e la proliferazione cellulare. La sua attivazione, mediante fosforilazione, porta all'attivazione di c-Jun e AP-1 con conseguente aumento trascrizionale dei geni deputati all'apoptosi. JNK1 può essere attivata da molti stimoli, tra i quali agenti ossidanti (Lo et al., 1996; Wilhelm et al., 1997), suggerendo un ruolo dello stato redox cellulare nei pathway di risposta allo stress mediati dalle MAP chinasi.

GSTP1 è in grado di interferire direttamente con JNK1: infatti può inibire l'iperfosforilazione e, conseguentemente, l'attivazione di JNK1 (Adler et al., 1999; Yin et al., 2000; Wang et al., 2001) tramite interazione diretta (Adler et al., 1999). Contrariamente a quanto accade nei processi di detossificazione, dove la forma dimerica di GSTP1 è la sola ad essere cataliticamente attiva, l'attività inibitoria di GSTP1 sulla fosforilazione di JNK1 si esplica esclusivamente nella forma monomerica. Soltanto in tale

forma la proteina è in grado di legare e sequestrare JNK1 (Adler et al., 1999; Wang et al., 2001).

In cellule non sottoposte a stress, l'attività chinasi di JNK1 è mantenuta a livelli basali a causa dell'interazione GSTP1/JNK1, mentre un aumento di tali livelli si osserva in fibroblasti di topo dove è stata soppressa la trascrizione di GSTP1 (Adler et al., 1999; Wang et al., 2001; Elsby et al., 2003). La formazione di questo complesso impedisce la fosforilazione e l'attivazione della stessa JNK1 e, di conseguenza, delle proteine a valle della via delle MAP chinasi, con conseguente inibizione dei geni attivatori dell'apoptosi (fig. 6).

Condizioni di stress ossidativo, quali trattamento con UV o  $H_2O_2$ , portano all'attivazione di una serie di pathway intracellulari, tra i quali quello delle MAP chinasi, con conseguente attivazione dei geni responsivi dell'apoptosi (Nose et al., 1991; Cobb et al., 1999; Adler et al., 1999; Yin et al., 2000). Come accennato prima, queste condizioni di stress portano all'oligomerizzazione delle GST in forma dimerica o multimerica (Shen et al., 1993; Bernardini et al., 2000; Cumming et al., 2001; Chang et al., 2001) e alla conseguente dissociazione del complesso GSTP1/JNK1 (Adler et al., 1999; Wang T. et al., 2001). Inoltre, tale stress ossidativo porta all'accumulo di GSTP1 in forma monomerica ossidata, inefficace nel legare e inibire JNK1 (Cumming et al., 2001; Wang et al., 2001).

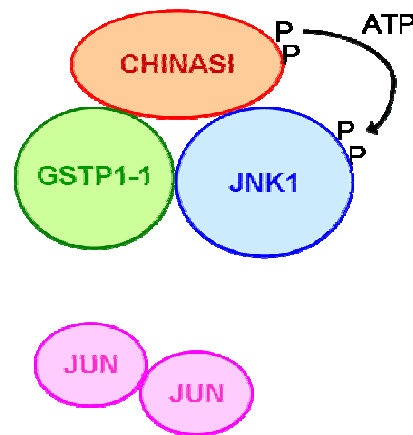
Sotto forma di multimeri/monomeri in forma ossidata, la GSTP1 non è più in grado di sequestrare JNK1 e impedirne la fosforilazione. JNK1, nello stato iperfosforilato, è in grado di attivare il pathway delle MAP chinasi con conseguente trascrizione dei geni deputati al processo apoptotico (Adler et al., 1999).

Quindi, GSTP1 sembra agire come un regolatore dello stress ossidativo della cellula tramite le sue due azioni: 1) funzione catalitica di detossificazione, coniugando glutazione a prodotti dannosi per la cellula e prevenendo così l'accumulo dei ROS ("Reactive Oxygen Species") che può

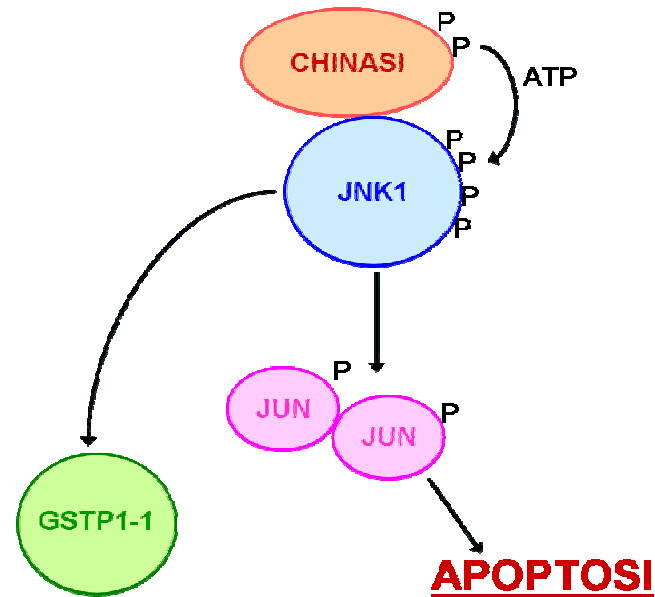
portare all'attivazione dei processi apoptotici; 2) funzione regolatoria, tramite interazione diretta e conseguente inibizione di JNK1.

L'attività inibitoria della GSTP1 sul pathway regolato da JNK1 risulta essere distinta dall'attività enzimatica ma entrambe contribuiscono ad instaurare il fenomeno della “farmacoresistenza” con conseguente fallimento del trattamento chemioterapico nel paziente neoplastico. L'elevata espressione della GSTP1 può, infatti, aumentare l'attività catalitica di detossificazione dei farmaci antitumorali e può alterare la regolazione dei pathway delle chinasi durante il trattamento farmacologico, conferendo alle cellule tumorali un potenziale vantaggio selettivo (Townsend et al., 2003). Ciò fornisce una spiegazione plausibile della resistenza, da parte dei tumori che over-esprimono GSTP1, a numerosi farmaci antitumorali che non sono substrato dell'enzima. A supporto di tale modello di regolazione della GSTP1, è stato osservato che immunodeplezioni della GSTP1 ottenute attraverso la formazione di complessi anticorpo  $\alpha$ -GST/ antigene GST o la sua inibizione con inibitori specifici, danno come risultato l'attivazione di JNK1 (Townsend et al., 2003). Uno degli obiettivi della chemioterapia sperimentale è l'individuazione o la sintesi di molecole in grado di interferire con il meccanismo inibitorio di GSTP1 su JNK1, in modo da aumentare l'effetto citotossico dei farmaci antineoplastici. È stata individuata la zona d'interazione tra GSTP1 e JNK1 e recenti studi mettono in evidenza l'efficacia di molecole sintetiche o peptidi in grado di inibire tale interazione e aumentare così la suscettibilità all'apoptosi da parte della cellula (Adler et al., 2004; Turella et al., 2007; Cui et al., 2008).

### CONDIZIONI NORMALI



### CONDIZIONI DI STRESS



**Fig. 6. Regolazione del processo apoptotico mediato da GSTP1.** In condizioni fisiologiche, GSTP1 si trova anche in forma monomerica ridotta ed è quindi in grado di inibire JNK1 e la conseguente cascata apoptotica. Induzione di stress ossidativo, portano all'ossidazione e/o multimerizzazione della GSTP1; in questo stato GSTP1 non è più in grado di legare JNK1 che viene così fosforilato attivando il processo apoptotico.



## **2 SCOPO DELLA TESI**

Il papillomavirus umano (HPV) presenta un marcato tropismo per i tessuti epiteliali, dove la persistente infezione determina lesioni squamose iperproliferative. Questi virus sono distinti in ceppi classificati a “a basso rischio”, che causano solo lesioni benigne localizzate, e “ad alto rischio”, che causano lesioni che possono evolvere verso la trasformazione neoplastica (Fehrmann and Laimins, 2003). In particolare, HPV-16 e -18 sono gli agenti eziologici di circa il 90% dei tumori alla cervice uterina e sono responsabili del 50% degli altri tumori ano-genitali (zur Hausen, 1996). Nella maggior parte dei tumori HPV positivi, è stata dimostrata l'integrazione del genoma virale nei cromosomi delle cellule infettate (zur Hausen, 1996; zur Hausen, 2000). Tale integrazione è responsabile della distruzione della maggior parte del genoma di HPV, eccezion fatta per i geni E6 ed E7 che vengono mantenuti ed espressi stabilmente nella cellula infettata, suggerendo un ruolo cruciale per le proteine E6 ed E7 nell'induzione della trasformazione maligna (zur Hausen, 1996; Munger, 2002; zur Hausen, 2002; Munoz et al., 2003). Tali oncoproteine sono note per svolgere diversi ruoli determinanti per il destino della cellula epiteliale infettata, principalmente perturbando la fine regolazione esistente tra proliferazione e differenziamento cellulare (Munger, 2002; zur Hausen, 2002; Helt and Galloway, 2003; Felsani et al., 2006).

Per quanto concerne la proteina E7, considerato il principale responsabile della capacità trasformante di HPV (Gage et al., 1990; zur Hausen, 1996; Zwerschke and Jansen-Durr, 2000; Munger et al., 2001), non sono stati ancora individuati compiutamente i meccanismi attraverso i quali l'infezione persistente può indurre trasformazione cellulare; anche se indubbiamente il ruolo ben descritto di E7 nell'interferenza con la funzione

dei fattori proteici della famiglia RB è molto importante per l'alterazione della regolazione del ciclo cellulare. risiede

Un altro ruolo importante di E7 nell'indurre la trasformazione cellulare consiste nella sua capacità di interferire con il processo apoptotico (vedi paragrafo 1.1.6). Dati recenti, ottenuti nel laboratorio dove è stata effettuata questa tesi, mostrano che nei cheratinociti umani immortalizzati (HaCaT) E7 HPV-16 è in grado di conferire alla cellula infettata un aumento della sopravvivenza cellulare inibendo l'attivazione del pathway apoptotico (Severino et al., 2007).

L'obiettivo di questa tesi è fornire ulteriori elementi per la comprensione dei meccanismi molecolari alla base del processo di carcinogenesi attraverso l'ulteriore caratterizzazione del ruolo svolto dalla oncoproteina E7 all'interno della cellula.

Una fase preliminare di questi studi, come accennato nel paragrafo 1.2, ha portato all'identificazione di diversi fattori cellulari in grado di interagire con E7, tra i quali Siva-1 (Severino et al., 2007), nm-23 (Mileo et al., 2006), Ran (De Luca et al., 2003). In questo lavoro è descritta l'identificazione e la caratterizzazione funzionale dell'interazione fisica dell'oncoproteina E7 di HPV-16 con la proteina glutatione S-transferasi P1 (GSTP1).

In forma multimerica, la GSTP1 presenta un'attività catalitica, ancillare con l'attività delle altre GST cellulari, coinvolta nei processi di detossificazione cellulare. Tale attività assume un ruolo importante sia nei fenomeni di sopravvivenza cellulare (resistenza a stress ossidativo) sia in quello della resistenza a chemioterapici delle cellule tumorali (Tew, 1994). In molti tumori, infatti, si assiste a un notevole aumento della quantità di prodotto proteico e dell'attività enzimatica di GSTP1 (Tew, 1994). Inoltre, la GSTP1, in forma monomerica, possiede un ruolo regolatorio di inibizione di una delle più importanti vie del processo apoptotico attraverso il suo legame con JNK1, interazione che impedisce l'attivazione di quest'ultima (Adler et al., 1999; Wang et al., 2001).

Dato che E7 è in grado di interferire con i processi cellulari e di alterare lo stress ossidativo in atto nella cellula (Shim et al., 2008) e che GSTP1 svolge un ruolo importante in entrambi questi processi, è interessante investigare sul significato biologico dell'interazione tra E7 e GSTP1 per fornire indicazioni sul ruolo tumorigenico svolto da E7 nelle cellule infettate.

## 3 MATERIALI E METODI

### 3.1 Costrutti plasmidici

I costrutti plasmidici utilizzati sono: pLXSN, pcDNA3T7tag, pDEST17, pGEX-2T.

Il vettore pcDNA3T7tag è stato utilizzato per la traduzione *in vitro* delle proteine E7 HPV-16 ed E7 HPV-16 Mut e per l'espressione ectopica della proteina E7 di HPV-16 in cellule eucariotiche. Il cDNA di E7 HPV-16 e E7 HPV-16 Mut è stato clonato all'interno del plasmide mediante i siti di restrizione EcoRI-BamHI. Tale vettore è caratterizzato dalla presenza di una corta sequenza derivata dal promotore procariotico T7 e definita "T7tag", dal gene per la resistenza all'antibiotico ampicillina e dal promotore CMV in grado di garantire una buona espressione ectopica della proteina d'interesse.

Il vettore di espressione retrovirale pLXSN è stato utilizzato per la produzione di virioni maturi contenenti il cDNA d'interesse E7 HPV-16 e E7 HPV-16 Mut. Tale cDNA è stato clonato, mediante i siti di restrizione EcoRI-BamHI, in frame alla sequenza HA-tag. Il plasmide pLXSN porta un marcatore di selezione (resistenza all'antibiotico gentamicina).

Le proteine ricombinanti GSTP1 e RCC1 sono state sintetizzate in sistemi batterici di *E. Coli*. Il suo cDNA è stata fuso in frame con la sequenza-tag 6 Hys, che viene utilizzato per facilitare la purificazione (tramite cromatografia di affinità) del prodotto proteico ricombinante. Per tali scopi, è stato utilizzato il costrutto plasmidico pDEST17, ottimizzato per la sintesi

di proteine eterologhe e caratterizzato dal promotore procariotico T7 e dalla presenza della resistenza all'ampicillina.

La proteina ricombinante pRb è stata sintetizzata in sistemi batterici di *E. Coli*. La sequenza codificante (cDNA) la proteina pRb è stata fusa in frame, mediante i siti di restrizione BamH1-BamH1, con la sequenza codificante la proteina glutatione S-transferasi di *S.japonicum* (GSTsj) nel vettore plasmidico pGEX-2T, ottimizzato per la sintesi di proteine eterologhe e caratterizzato dal presenza della resistenza all'ampicillina.

### 3.2 Mutagenesi sito-specifica

Mutazioni puntiformi dei costrutti plasmidici pcDNA3T7tag e pLXSN contenenti la sequenza nucleotidica di E7 HPV-16 sono state ottenute usando il "QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit" (Stratagene). Sono state effettuate una serie di reazioni di PCR utilizzando specifici oligonucleotidi con sequenze nucleotidiche mutate al fine di ottenere sostituzioni aminoacidiche specifiche nella proteina E7 di HPV16 (i tre residui aminoacidici, H<sub>51</sub>, R<sub>66</sub>, E<sub>80</sub>, sono stati sostituiti con tre residui di alanina).

Gli oligonucleotidi utilizzati per le reazioni di PCR sono:

Mutazione singola (H<sub>51</sub>A)

5'-GCAGAACCGGACAGAGCCGCTTACAATATTGTAACC-3'

5'-GGTTACAATATTGTAAGCGGCTCTGTCCGGTTCTGC-3'

Mutazione singola (R<sub>66</sub>A)

5'-CAAGTGTGACTCTACGCTTGCGTTGTGCGTACAAAGCACAC-3'

5'-GTGTGCTTTGTACGCACAACGCAAGCGTAGAGTCACACTTG-3'

Mutazione singola (E<sub>80</sub>A)

5'-GACATCCGTACGTTGGCAGACCTGTTAATGGGCACAC-3'

5'-GTGTGCCCATTAACAGGTCTIGCCAACGTACGGATGTC-3'

In ciascuna sequenza nucleotidica, le parti sottolineate indicano la mutazione puntiforme introdotta alla quale corrisponde una sostituzione aminoacidica nella proteina E7 di HPV16.

I cicli di amplificazione polimerasica sono stati effettuati nelle seguenti condizioni sperimentali: dopo un'iniziale denaturazione del campione (95° C per 2 minuti), sono stati eseguiti 12 cicli di amplificazione. Ciascun ciclo è composto da tre fasi: 1) denaturazione a 95° C per 30 secondi; 2) appaiamento a 55° C per 50 secondi; 3) polimerizzazione a 68° C per 5 minuti.

Alla fine di tali cicli, il DNA plasmidico parentale (non contenente le mutazioni) è stato digerito dall'enzima DpnI che è in grado di riconoscere e digerire selettivamente solo il DNA metilato. Tale DNA linearizzato non è in grado di trasformare cellule di E.coli; trasformazione che avviene, invece, con il DNA plasmidico contenente le mutazioni, che è rimasto inalterato nella forma circolare in quanto non digerito enzimaticamente. Sia i siti di mutazione che le intere sequenze nucleotidiche dei nuovi costrutti codificanti la forma mutata di E7 HPV-16 sono stati verificati tramite sequenziamento di tale DNA. La proteina codificata da tale sequenza mutata è stata denominata E7 HPV-16 Mut.

### 3.3 Colture cellulari

I modelli sperimentali impiegati in questo studio sono rappresentati:

1) dalla linea cellulare di cheratinociti umani immortalizzati (HaCaT), capaci di subire un parziale differenziamento *in vitro* (Boukamp et al.

1988); è stata scelta questa linea in quanto i Papillomavirus mostrano un tropismo ristretto alle cellule del tessuto epiteliale (vedi paragrafo 1.1.1);

2) dalla linea cellulare “packaging” Phoenix che deriva dalla linea cellulare 293T, cellule di rene embrionale umano trasformate con E1A di adenovirus (Kinsella and Nolan, 1996); tale linea contiene, stabilmente integrati nel genoma, i geni virali *gag*, *pol* ed *env* necessari per la replicazione di costrutti retrovirali e la formazione del virione maturo (virus anfortropici);

3) dalla linea cellulare di carcinoma mammario (MCF-7) (Brooks et al., 1973); questa linea non esprime la proteina GSTP1 (Moscow et al., 1989).

Tali linee cellulari sono state coltivate a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> in terreno DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium, GIBCO Invitrogen) addizionato con 10% di siero fetale bovino (GIBCO Invitrogen), 200 mM L-Glutammina, 50 µg/ml ml penicillina, e 50 µg/ml streptomicina (GIBCO BRL).

Le linee cellulari sono state mantenute come colture monostrato ad una densità cellulare intorno al 40% (per quanto riguarda le HaCaT) e 70-80% (per le MCF-7 e per le Phoenix).

### **3.4 “Mimotopes technology”**

La tecnica Mimotopes prevede la sintesi su supporti di polipropilene (pin) di oligopeptidi (Geysen et al. 1984; Maeji et al. 1990) la cui sequenza riproduce l'intera oncoproteina E7 (98aa) (Mimotopes Pty Ltd, Clayton, Victoria, Australia). Tali oligopeptidi sono stati prodotti come dodecameri dove il peptide “n+1” condivide 9 aminoacidi col peptide “n”. Le reazioni di polimerizzazione sono guidate in modo tale da non coinvolgere le catene laterali degli aminoacidi in reazioni secondarie tramite l'utilizzo di gruppi protettori. Tutti gli aminoacidi utilizzati per la sintesi hanno il gruppo aminico temporaneamente protetto dal composto chimico FMOC (9-

fluorenil-metilosocarbonilico) che può essere facilmente rimosso in condizioni basiche blande (quali la piperidina), mentre i gruppi reattivi delle catene laterali sono protetti in maniera stabile e vengono rimossi soltanto alla fine della sintesi dell'intero oligopeptide. La sintesi ha inizio su una piccola punta (pin) di materiale plastico inerte (polietilene) al quale è attaccato l'aminoacido C-terminale. Terminata la loro sintesi, i diversi oligopeptidi sono stati saggiati per la loro abilità di interagire in modo specifico con la proteina ricombinante GSTP1. Infine, la quantità di GSTP1 legata da ogni singolo pin è stata quantificata tramite un saggio immunoenzimatico (ELISA).

### **3.5 Studio molecolare dell'interazione tra GSTP1 e il dominio CR3 di E7 HPV-16 (modello docking)**

Come punto di partenza, è stato ipotizzato che l'interazione tra E7 HPV-16 e GSTP1 coinvolga le due proteine, rispettivamente, nella loro forma dimerica e monomerica. Per quanto concerne E7 HPV-16, è stato preso in considerazione solamente il dominio CR3 (dal residuo 48 al 98).

Il modello molecolare della struttura tridimensionale del dominio dimerizzato CR3 di E7-HPV16 è stato costruito mediante il programma MODELLER© release 8v2 (Sali and Blundell, 1993) per omologia prendendo come modello iniziale la struttura tridimensionale nota del dominio dimerizzato CR3 di E7 HPV-1A.

La struttura del monomero di GSTP1 è stata presa dal Protein Data Bank (PDB), struttura 1AQW, dove tale proteina si trova co-cristallizzata col suo cofattore, il glutatione, e con un suo substrato, il clorambucile. In tal modo sono evidenziati i due siti attivi dell'enzima: il G-site e l'H-site.



Il modello docking dell'interazione tra i dimeri CR3 di E7 HPV-16 e il monomero di GSTP1 è stato effettuato usando il programma Hex v4.5 (Department of Computing Science, University of Aberdeen, Aberdeen AB24 3UE, Scotland, UK; <http://www.csd.abdn.ac.uk/hex>), includendo tutte i possibili orientamenti rotazionali e traslazionali delle due strutture. I primi 500 docking model ottenuti sono stati esaminati per selezionare il modello di interazione con miglior complementarietà di superficie e massimo numero di ponti salini intermolecolari.

### **3.6 Trasformazione di *E.Coli***

I plasmidi sono stati amplificati in cellule batteriche rese permissive all'entrata di DNA circolare (processo di trasformazione). A tale scopo è stato utilizzato il ceppo batterico XL-1blu di *E.Coli*. Il DNA plasmidico (50 ng) è stato aggiunto alle cellule batteriche in sospensione in presenza di una soluzione salina KCM 1X (0.1M KCl, 0.03M CaCl<sub>2</sub>, 0.05M MgCl<sub>2</sub>). La trasformazione è stata condotta, in un volume finale di 200 µl, per 20 minuti a 4°C e per 2 minuti a 42°C. La rapida escursione termica danneggia la membrana plasmatica facilitando così l'entrata di DNA esogeno. In seguito è stato aggiunto 1 ml di terreno di coltura LB (LB per litro di soluzione: 5g NaCl, 10 g triptone, 5g estratto di lievito) e le cellule trasformate sono state incubate a 37°C per 50 minuti in agitatore termostato. Il ceppo batterico XL-1blu è stato, quindi, seminato in capsule Petri con terreno di coltura LB/agar (LB + 2% agar) contenente ampicillina (50 µg/ml). L'antibiotico permette la crescita selettiva delle cellule portatrici della resistenza all'ampicillina, funzione codificata dal plasmide introdotto all'interno delle cellule. Dopo incubazione delle piastre per circa 12 ore a 37°C, le colonie batteriche ampicillina-resistenti sono state raccolte per l'estrazione del DNA plasmidico.

### **3.7 Estrazione del DNA plasmidico da ceppi batterici**

Il DNA plasmidico è stato estratto utilizzando il kit Quiagen. I batteri trasformati sono stati amplificati incubandoli in terreno LB/ampicillina a 37°C per 15 ore. In seguito sono stati centrifugati a 4°C a 5000g per 10 minuti. Il pellet batterico così ottenuto è stato risospeso in una soluzione contenente 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA e RNasi A (100 µg/ml). L'aggiunta di NaOH (0.2 M) e SDS (1%) permette la lisi alcalina delle cellule batteriche; poi tale soluzione è stata neutralizzata tramite una soluzione 3M KAc (pH 5.5) e il lisato centrifugato a 4° C a 12000g per 30 minuti.

Il sovranatante ottenuto è l'estratto batterico dal quale si purifica il DNA plasmidico d'interesse. Il metodo utilizzato è la cromatografia a scambio ionico che intrappola efficacemente solo il DNA plasmidico. L'estratto batterico è stato caricato su una colonna Quiagen, precedentemente attivata con un tampone di equilibratura (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, 15% etanolo, 0.15% Triton X-100). La colonna è stata lavata due volte con un tampone opportuno (1M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, 15% etanolo) per eliminare sostanze contaminanti. Il DNA plasmidico è stato eluito con una soluzione di 1.25M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 15% etanolo, precipitato con isopropanolo, lavato con etanolo 70% e risospeso in un adeguato volume di acqua. La quantità di DNA plasmidico ottenuto è stata determinata mediante lettura allo spettrofotometro (260-280 nm) e conservata a -20°C.

Il DNA plasmidico estratto è stato analizzato mediante elettroforesi su gel con concentrazioni variabili di agarosio in relazione alle dimensioni dei frammenti di DNA da separare. Le corse elettroforetiche sono state condotte in tampone TBE (90 mM Tris, 90 mM acido borico, 2.5 mM EDTA, pH 8.2) con l'aggiunta di bromuro di etidio (concentrazione finale

di 1 µg/ml), un intercalante del DNA che consente la visualizzazione delle bande ottenute.

### **3.8 Sintesi delle proteine di fusione**

Le proteine di fusione utilizzate nei saggi di interazione *in vitro* sono: N-6Hys-GSTP1, N-6Hys-RCC1, GSTsj-pRb e GSTsj. I batteri *E.coli* del ceppo BL21, trasformati con i vettori pCDNA3T7tag e pDEST17 contenenti i rispettivi cDNA di interesse, sono stati incubati a 37°C per 4 ore nel terreno di coltura LB addizionato con l'antibiotico ampicillina (50 µg/ml). Per indurre in tali ceppi l'espressione delle proteine di fusione è stato aggiunto IPTG (isopropil-1-tio-β-D-galattopiranoside) alla concentrazione finale di 0.4 mM. Questa molecola è un induttore del promotore presente nel vettore plasmidico. Terminata la fase di induzione, i batteri sono stati centrifugati per 10 minuti a 6000g a 4°C.

Il processo di purificazione delle proteine di fusione con la GSTsj è diverso da quelle di fusione con le 6 istidine.

Per la purificazione delle proteine di fusione con GSTsj, il pellet batterico è stato risospeso in NENT buffer (Tris 20 mM, pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Nonidet P-40 0.5%) in presenza di inibitori delle proteasi (1mM PMSF, 10 µg/ml leupeptina), sottoposto a sonicazione, per accentuare la rottura delle cellule batteriche, e centrifugato per 15 minuti a 6000g. Il supernatante è stato recuperato, mentre il pellet è stato risospeso in NENT + N-laurilsarcosil al 2% e poi nuovamente centrifugato. I due supernatanti così ottenuti sono stati separatamente incubati con 200 µl di resina glutatione-sefarosio (Amersham) a 4°C per 3 ore su piattaforma rotante. Successivamente la resina è stata centrifugata e lavata due volte in NENT buffer + NaCl al 7% e due volte in buffer e, infine, risospesa in NENT

completo di inibitori delle proteasi (10 µg/ml di leupeptina e 10 mM di PMSF).

Per la purificazione della proteina coniugata alle 6 istidine, il pellet batterico è stato risospeso in un tampone di lisi (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazolo, pH 8.0) in presenza di inibitori delle proteasi, sottoposto a sonicazione e centrifugato. Il supernatante è stato incubato con 200 µl di resina Ni-NTA agarosio a 4°C per 3 ore su piattaforma rotante; successivamente la resina è stata centrifugata e lavata due volte in “Wash Buffer” (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazolo, pH 8.0) e risospesa nel tampone di lisi completo di inibitori delle proteasi (10 µg/ml di leupeptina e 10 mM di PMSF).

### **3.9 Saggio di interazione *in vitro***

Il DNA plasmidico (1µg) codificante per la proteina E7 HPV-16 o per E7 HPV-16 Mut è stato trascritto come RNA specifico e tradotto in proteina mediante una reazione *in vitro* (TnT kit). La miscela di reazione (12.5 µl totali) contenente lisato di reticolociti di coniglio, [35S]-metionina e [35S]-cisteina (20 µCi) e l'enzima T7 RNA-polimerasi è stata incubata per 1 ora a 30°C. Aliquote della miscela di reazione (6µl) contenenti le proteine E7 HPV-16 e E7 HPV-16 Mut tradotte *in vitro* sono state incubate in tampone di lisi per 60 minuti a 4°C in presenza di: 1) resina Ni-NTA agarosio coniugata o a 4 µg della proteina chimerica 6Hys-RCC1 (controllo negativo) o a 4 µg della proteina di fusione 6Hys-GSTP1 o 2) resina coniugata a 4 ug della proteina chimerica GSTsj-pRb o 4 ug della proteina GSTsj (controllo negativo). La sospensione di agarosio dopo tre lavaggi con 1 ml di “Wash Buffer” (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM

imidazolo, pH 8.0) è stata risospesa in 10 µl di "Laemli buffer" 2X. Le proteine sono state staccate dalla resina mediante denaturazione a 95°C per 5 minuti e separate su SDS-PAGE. Il gel di poliacrilamide (12%) è stato disidratato ed esposto a -70°C usando pellicole autoradiografiche Kodak Bio-Max.

### **3.10 Sistemi di espressione ectopica in cellule eucariotiche**

Negli esperimenti di espressione ectopica transiente di sequenze di DNA d'interesse (metodo della trasfezione) effettuati nelle Phoenix è stato utilizzato il costrutto E7 HPV-16 pCDNA3T7tag.

Le cellule Phoenix sono state seminate in piastre da 100 mm (numero cellule seminate per piastra:  $2 \times 10^6$ ). Dopo 24 ore di incubazione, arrivate ad una densità cellulare del 70%, è stata effettuata la trasfezione con il metodo classico del calcio-fosfato (Jordan e Wurm, 2004). Il DNA plasmidico (da 5 a 25 µg) è stato diluito in 300 µl di una soluzione  $\text{CaCl}_2$  200 mM. A tale soluzione sono stati aggiunti 300 µl di HBS 2X (0.05M Hepes, 0.14M NaCl, 1.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.15), incubata per 30 minuti a temperatura ambiente e aggiunta alla coltura cellulare. Il terreno di coltura cellulare presenta anche cloroquina alla concentrazione di 25 µM. La cloroquina è un inibitore delle DNasi lisosomiali. Dopo 18 ore d'incubazione è stato eliminato il precipitato ed è stato aggiunto alla coltura terreno fresco. Trascorse ulteriori 30 ore, le cellule sono state raccolte e lisate.

### **3.11 Infezione retrovirale**

Per ottenere virioni maturi contenenti il DNA d'interesse,  $3 \times 10^6$  cellule Phoenix, seminate su capsule Petri da 100mm di diametro e tenute in

incubazione per 24 ore, sono state trasfettate, con il metodo del calcio-fosfato (Jordan e Wurm, 2004), con 15 µg di DNA ed incubate a 37°C (si veda paragrafo 3.10). Sono stati utilizzati i seguenti DNA: pLXSN, pLXSN di E7HA HPV-16, pLXSN di E7HA HPV-16 Mut.

In breve, il DNA plasmidico è stato diluito in 300 µl di una soluzione CaCl<sub>2</sub> 200 mM. A tale soluzione sono stati aggiunti 300 µl di HBS 2X (0.05 M Hepes, 0.14 M NaCl, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.15), incubata per 30 minuti a temperatura ambiente e aggiunta alla coltura cellulare. Il terreno di coltura cellulare presenta anche cloroquina (inibitore delle DNasi lisosomiali) alla concentrazione di 25 µM. Dopo 18 ore d'incubazione è stato eliminato il sovrnatante e aggiunto alla coltura terreno fresco.

Trascorse 48 ore dalla trasfezione, i sovrnatanti di ciascuna capsula, contenenti un alto titolo di retrovirus ricombinanti, sono stati raccolti, filtrati (per eliminare i detriti cellulari) utilizzando filtri dal diametro di 0.45 µm ed è stato aggiunto polybrene (Sigma, St.Louis, MO), alla concentrazione di 8 µg/ml (per favorire l'adsorbimento del virus alle cellule). I sovrnatanti così trattati sono stati aggiunti in volumi di 1 ml a piastre da 100mm di diametro seminate con cellule HaCaT o con cellule MCF-7 alla densità del 40%. Le piastre sono state poi centrifugate per 1 ora a 3000g a 24°C e incubate per 3 ore a 32°C.

Le cellule sono state sottoposte a un secondo ciclo di infezione ed incubate per 16 ore a 32°C. In seguito i cloni cellulari infettati sono selezionati utilizzando terreno DMEM contenente l'antibiotico gentamicina (Sigma, St. Louis, MO) alla concentrazione di 1 g/ml e incubate nuovamente a 37°C. In tal modo solamente le cellule infettate riescono a proliferare. Le cellule vengono fatte crescere in terreno selettivo per 7 giorni, diminuendo la concentrazione della selezione fino ad arrivare ad una concentrazione di 350 µg di gentamicina per ml di terreno.

### **3.12 Silenziamento dell'espressione genica di GSTP1 ("small interfering RNA")**

Per ottenere una forte riduzione della produzione proteica di GSTP1 cellulare sono state utilizzate brevi sequenze di RNA (GSTP1 siRNA) che si appaiano in modo specifico all'RNA messaggero di GSTP1 e ne causano la degradazione (metodo dell'interference). Il controllo negativo è rappresentato da sequenze di RNA (Non-targeting, NT siRNA) che non legano alcun RNA messaggero della cellula.

Per consentire l'entrata di RNA esogeno all'interno della cellula (metodo della trasfezione), è stato utilizzato il reagente Lipofectamina 2000 (Invitrogen). 24 ore prima della trasfezione,  $1 \times 10^5$  cellule HaCaT sono state seminate in piastre da 35 mm di diametro per ottenere una densità cellulare del 30% al momento della trasfezione. 50 nM di On-Target GSTP1 siRNA (SMARTpool L-011179) o di On-Target plus siCONTROL (Non-targeting pool, D-001810-10 Dharmacon) sono stati aggiunti in una provetta contenente 250ul di terreno DMEM + 200 mM L-Glutamina. È stata preparata un'altra provetta con 250ul di terreno DMEM + 200 mM L-Glutamina e 10ul di Lipofectamina 2000. Queste due soluzioni sono state tenute a incubare separatamente per 5 minuti e poi miscelate insieme e incubate per 20 minuti a temperatura ambiente. Nel frattempo, è stato eliminato il terreno dalle piastre seminate con le cellule, effettuato un lavaggio con PBS 1X e aggiunto 1.5 ml di terreno DMEM + 200 mM L-Glutamina + 10% di siero fetale bovino. Trascorsi i 20 minuti dell'incubazione, la soluzione della provetta è stata aggiunta al terreno di coltura e tenuta ad incubare a 37°C. Dopo 5 ore, è stato eliminato il terreno di coltura dalle piastre contenente la lipofectamina e aggiunto terreno DMEM + 200 mM L-Glutamina + 10% di siero fetale bovino + 50 µg/ml penicillina e 50 µg/ml streptomina.

Il livello proteico di GSTP1 è stato analizzato mediante Western blotting a 72 ore dalla trasfezione.

Per monitorare l'efficienza di trasfezione, sono stati utilizzati dei piccoli RNA (siCONTROL TOX Non Targeting siRNA, D-001500-01 Dharmacon) che si legano e causano la degradazione dell'mRNA di un gene essenziale per la sopravvivenza cellulare. Trascorse 24 ore dalla trasfezione, è stato contato il numero di cellule vive mediante colorazione Trypan.

### **3.13 Valutazione dell'espressione proteica (saggio Western blot)**

Le cellule cresciute in monostrato sono state trattate con PBS 1X (NaCl 8 g/l, KCl 0.2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.25 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/l), per rimuovere il terreno di coltura residuo, e successivamente con tripsina, per staccarle dal supporto sul quale crescono. Tali cellule vengono centrifugate e lisate in ghiaccio per 30 minuti in un opportuno volume di buffer di lisi complementato con inibitori delle proteasi cellulari (1mM PMSF, 10 µg/ml leupeptina) e delle fosfatasi (1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.5mM NaF, 10 mM paranitrofenilfosfato). Il buffer di lisi utilizzato è: buffer USA (50mM Tris-HCl pH 7.4, 5mM EDTA, 250mM NaCl, 50mM NaF, 0.1% TRITON-X-100, 0.1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). Il lisato è stato centrifugato a 14000g a 4°C per 20 minuti. Prelevato il sovrantante, è stata effettuata una determinazione quantitativa proteica secondo il metodo colorimetrico di Bradford.

In seguito, il lisato proteico di ciascun campione (10-30 µg) è stato trattato con un adeguato volume del tampone di preparazione Laemli buffer 1X (2% SDS, 10% glicerolo, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8 + 5% β-mercaptoetanolo per il gel in condizioni riducenti). Le proteine sono state denaturate a 95°C per 5 minuti e separate mediante elettroforesi su gel di SDS-poliacrilamide al 10-12%. La corsa elettroforetica è stata eseguita



utilizzando il tampone di corsa (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS, pH 8.3). Le proteine separate nel gel sono state trasferite (blotting) su una membrana PVDF (Immobilon-p, Millipore) precedentemente attivata in metanolo per 2 minuti ed equilibrata per 5 minuti nel tampone di trasferimento (25mM TRIS-HCl, 192mM glicina, pH 8.3, 20% metanolo). Il trasferimento è stato eseguito per 1 ora a 100V (voltage costante) utilizzando il tampone di trasferimento mediante l'apparato Trans Blot Biorad.

I siti di legame aspecifico della membrana sono stati bloccati per 1 ora a temperatura ambiente con TBS-T 1X (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 137 mM NaCl + 0.5% Tween-20) e 5% di latte scremato in polvere (NFDM). Successivamente, la membrana è stata incubata con l'anticorpo primario (diluito in TBS-T + 5% NFDM), specifico per la proteina d'interesse, per 16 ore a 4°C.

La valutazione dei livelli di espressione delle diverse proteine prese in esame è stata effettuata mediante incubazione con i seguenti anticorpi: anti-HA (anticorpo monoclonale, diluizione 1:1000, Cell Signaling), anti-Phospho-SAPK/JNK (anti-PJNK) (anticorpo policlonale, diluizione 1:1000, Cell Signaling), anti-GSTP1 (anticorpo policlonale, diluizione 1:10000, StressGen), anti-JNK (anticorpo policlonale, diluizione 1:1000, Cell Signaling).

Finita l'incubazione con l'anticorpo primario, sono stati effettuati lavaggi con abbondanti volumi di TBS-T 1X per 2 ore. Per le rilevazioni immunoenzimatiche le membrane sono state poi incubate per 45 minuti a temperatura ambiente con anticorpi secondari (specifici per le IgG dell'animale nel quale è stato prodotto l'anticorpo primario) coniugati con l'enzima perossidasi e diluiti in TBS-T + 5% latte NFDM (diluizione: 1:10000).

Dopo lavaggi in eccesso, il segnale è stato evidenziato mediante una reazione di chemiluminescenza utilizzando il Western Blotting Detection Kit, Amersham (ECL o ECL Advance).

Per la normalizzazione del segnale, le membrane sono state successivamente incubate con l'anticorpo specifico per il gene "housekeeping"  $\beta$ -actina (anticorpo monoclonale, diluizione 1:3000, ICN).

### **3.14 Analisi dell'equilibrio redox cellulare**

#### **3.14.1 Analisi di TBARS (sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico)**

Il livello dei TBARS cellulari è stato misurato utilizzando il protocollo descritto in Jentzsch et al. (Jentzsch et al., 1996). I lisati cellulari, in presenza di idrossitoluene butilato, sono stati aggiunti a una soluzione contenente acido ortofosforico e tiobarbiturico e incubati per 45 minuti a 90 °C. La reazione è stata bloccata in ghiaccio e la soluzione trattata con *n*-butanolo. La fase alcoolica è stata separata da quella acquosa mediante centrifugazione. La fase superiore è stata analizzata per la quantificazione di malondialdeide (MDA) che forma con l'acido tiobarbiturico un prodotto misurabile spettrofotometricamente. La curva di riferimento è stata ottenuta usando concentrazioni note di MDA (1.25, 0.5, 0.25 e 0.1  $\mu$ M). I valori di TBARS così ottenuti sono stati espressi come nmoli/mg di proteina.

### **3.14.2 Analisi dei PUFAs (acidi grassi poli-insaturi)**

I lisati cellulari sono stati estratti due volte in una soluzione di cloroformio-metanolo (2:1) in presenza di 100 ug dell'antiossidante butil-idrossi-toluene. La frazione fosfolipidica è stata purificata mediante cromatografia. Gli acidi grassi contenuti in questa frazione sono stati transesterificati con una soluzione di sodio metossido in metanolo e analizzati usando un sistema combinato di gas cromatografia e spettrometria di massa (Hewlett Packard 5890 II gas chromatography combined with 5989 mass spectrometry) su colonna capillare (FFA-P, 60 m x 0.32  $\mu$ m x 0.25 mm, Hewlett Packard) con un gradiente di temperatura (10°C al minuto) da 80 a 200 °C. Il valore dei PUFA è espresso come ug/mg di proteina (Passi et al., 1991).

### **3.14.3 Analisi dell'attività di enzimi antiossidanti**

L'attività di tre enzimi antiossidanti (superossido dismutasi, glutathione perossidasi e catalasi) è stata determinata sulla soluzione di lisato cellulare ottenuta dopo lisi delle cellule mediante congelamento in azoto liquido e scongelamento (ripetuto diverse volte) e susseguente centrifugazione a 10000 g per 10 minuti a 4 °C.

L'attività della superossido dismutasi (SOD) è stata valutata mediante il protocollo descritto da Spitz and Oberley (Spitz and Oberley, 1989). In questo protocollo, è utilizzato il sistema *in vitro* di ipoxanthine-xantine ossidasi per produrre radicali superossidi; la quantità di superossidi prodotta è misurabile in quanto riducono il nitro-blue tetrazolio (NBT) in un composto rilevabile spettrofotometricamente. Una diminuzione della riduzione del NBT fornisce un'indicazione della quantità di attività della superossido dismutasi della soluzione del lisato cellulare, in

quanto tale enzima utilizza come substrato i radicali superossidi. L'attività totale dell'enzima è stata misurata a pH 7.8 in un fosfato buffer. Un'unità di attività è definita come la quantità di proteina che causa il 50% di diminuzione della riduzione del NTB. I risultati sono visualizzati come unità di enzima per mg di proteina.

L'attività della catalasi (Cat) è stata determinata spettrofotometricamente misurando la scomparsa del perossido d'idrogeno (10 nM) (Claiborne, 1985). 2 ml di una soluzione di 10nM di perossido d'idrogeno e 0.2 M di buffer fosfato (pH 7.4) sono mescolati con 10-50  $\mu$ l della soluzione di lisato cellulare. La cinetica di consumo del perossido d'idrogeno è stata valutata per 2' a 25°C (240nm) e i valori ottenuti convertiti in unità di attività enzimatica sulla base dei dati di una curva standard ottenuti usando quantità note di enzima. Tali unità sono normalizzate per il contenuto di proteine nella soluzione di lisato cellulare analizzato.

L'attività della glutathione perossidasi (GSH-Px) è stata misurata utilizzando come substrato il glutathione ridotto e il *t*-butil idroperossido. In presenza di un eccesso di glutathione reduttasi e NADPH, il glutathione ossidato dalla GSH-Px è immediatamente convertito nella forma ridotta con conseguente ossidazione del NADPH in NADP<sup>+</sup>. La diminuzione nell'assorbanza del NADPH è monitorata a 340 nm (Flohe and Gunzler, 1984). I risultati, espressi come media  $\pm$  SD, sono espressi in unità di attività enzimatica per mg di proteina.

#### **3.14.4 Attività enzimatica della GSTP1**

L'attività enzimatica delle GST cellulari è stata misurata, sia in presenza che in assenza di acido etacrinico, EA (un inibitore specifico della GSTP1, concentrazione: 4  $\mu$ M), usando il Glutathione S-Transferase Assay Kit (Sigma) e, come substrato elettrofilo, il 1-chloro-

2,4-dinitrobenzene (CDBN). La reazione di coniugazione del gruppo tiolico del glutathione al substrato CDBN è stata monitorata registrando i cambiamenti dell'assorbanza a 340 nm da 1 a 5 minuti dall'inizio della reazione. L'aumento dell'assorbanza è direttamente proporzionale all'attività delle GST (attività espressa come nmoli di CDNB/min/mg di proteina). L'attività a carico della GSTP1 è stata calcolata tramite differenza tra le due misurazioni osservate (in assenza e in presenza di EA). I risultati sono espressi come media  $\pm$  SEM di tre differenti determinazioni effettuate in duplicato.

### **3.14.5 Determinazione del contenuto cellulare del glutathione**

Il livello di glutathione ridotto (GSH) è stato determinato in lisati cellulari mediante HPLC-MS (spettrometria di massa accoppiata alla cromatografia liquida ad alta pressione) come descritto da Marchese et al. (Marchese et al., 2003). Per prevenire l'auto-ossidazione del glutathione la lisi delle cellule è stata effettuata in soluzione acquosa contenente 10 nM di N-etilmaleimide. 20 nM di acido tiosalicilico (TSA) sono stati aggiunti per avere uno standard interno mentre acetonitrile è stato aggiunto per consentire la precipitazione delle proteine presenti nel lisato. Dopo centrifugazione a 10000g per 5 minuti, la soluzione è stata analizzata tramite sistema HPLC-MS. Il valore medio di tre misurazioni è espresso come nmoli di GSH per mg di proteina.

### **3.15 Metodi chimico – fisici per l'induzione di morte cellulare**

#### **3.15.1 Irradiazione con UV**

Cellule HaCaT infettate con pLXSN, E7HA HPV-16 pLXSN e E7HA HPV-16 3M pLXSN sono state sottoposte, in assenza di terreno di coltura, ad un trattamento radiante UVB (290-320nm) per 8 secondi all'interno di una "camera ad UV". L'energia di irradiazione è, in questo apparato radiante e in queste condizioni sperimentali, pari a 8 mJ/cm<sup>2</sup>. Trascorso tale tempo, è stato aggiunto alle cellule del terreno di coltura e sono state incubate per 1 ora e 30 minuti, 5, 8 o 24 ore a 37°C e utilizzate per effettuare Western Blotting o per conte di vitalità cellulare.

#### **3.15.2 Trattamento con perossido di idrogeno**

Cellule HaCaT infettate con pLXSN e con E7HA HPV-16 pLXSN sono state seminate in piastre da 35 mm di diametro in 1.5 ml di terreno di coltura contenente 0.5 mM di perossido d'idrogeno. Trascorsi 30 minuti, per eliminare il perossido d'idrogeno, è stato cambiato il mezzo di coltura e dopo 5 ore e 30 minuti le cellule sono state raccolte per valutare l'espressione di GSTP1 tramite Western blotting.

### **3.16 Analisi della vitalità cellulare**

La vitalità cellulare è stata valutata utilizzando il metodo della colorazione TRIPAN.

Le cellule sono state staccate dal supporto plastico mediante tripsina, incubate con lo 0.4% di TRIPAN BLUE (Invitrogen) e osservate al microscopio. Soltanto le cellule vitali sono in grado di espellere all'esterno

tale colorante; la percentuale di tale popolazione di cellule è stata determinata contando, in un emocitometro, 100 cellule per ogni esperimento. Ciascun esperimento è stato effettuato in quadruplicato.

### **3.17 Saggio TUNEL**

Il saggio TUNEL (“Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick and labeling”) consente la visualizzazione di corpi apoptotici rilevata con tecniche di microscopia a fluorescenza, (kit utilizzato: “*In situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein”, Roche). La metodica si basa sulla marcatura enzimatica delle estremità 3'-OH di sequenze oligonucleotidiche di DNA che si formano durante la frammentazione nucleotidica tipica dei fenomeni apoptotici, tramite l'azione dell'enzima deossinucleotidil-transferasi terminale (TdT). Questo enzima è in grado di catalizzare la reazione di polimerizzazione del DNA in modo aspecifico cioè templatoindependente. Uno dei 4 deossiribonucleotidi (il dUTP) presenti nella miscela di reazione è coniugato con una molecola di fluoresceina, che assorbe a una lunghezza d'onda compresa tra 450 e 500 nm con conseguente emissione fluorescente alla lunghezza di 515-565 nm (colorazione verde). Cellule HaCaT infettate con pLXSN E7 HPV-16 e pLXSN, dopo essere state esposte ad irradiazione UV (vedi paragrafo 3.14.1), sono state sottoposte a trattamento fissativo in paraformaldeide 3% (in PBS 1X, pH 7.4) per 20 minuti a temperatura ambiente. Dopo un lavaggio in PBS 1X, tali cellule sono state incubate per 5 minuti in presenza di Triton X-100 0.5% (in PBS 1X, pH 7.4) in modo da permeabilizzare le membrane. Dopo ulteriori lavaggi le cellule sono state incubate per 1 ora a 37°C al buio con una soluzione contenente l'enzima TdT e la miscela di nucleotidi (kit Roche). I campioni sono stati quindi analizzati al microscopio a fluorescenza alla lunghezza d'onda di 515-565nm. Per

ottenere una visualizzazione dei nuclei, le cellule sono state trattate con il colorante cellulare Hoechst 33342 (1 ug/ml) per 5 minuti a temperatura ambiente. Tale sostanza, intercalandosi al DNA, consente una specifica colorazione blu di tutti i nuclei senza interferire con la colorazione TUNEL che, invece, renderà visibili i soli nuclei apoptotici.

### **3.18 Analisi statistica dei risultati sperimentali**

Per una valutazione sulla significatività statistica dei risultati ottenuti, è stato utilizzato il test  $t$  di Student a due code. I valori di  $P < 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi.



## **4 RISULTATI**

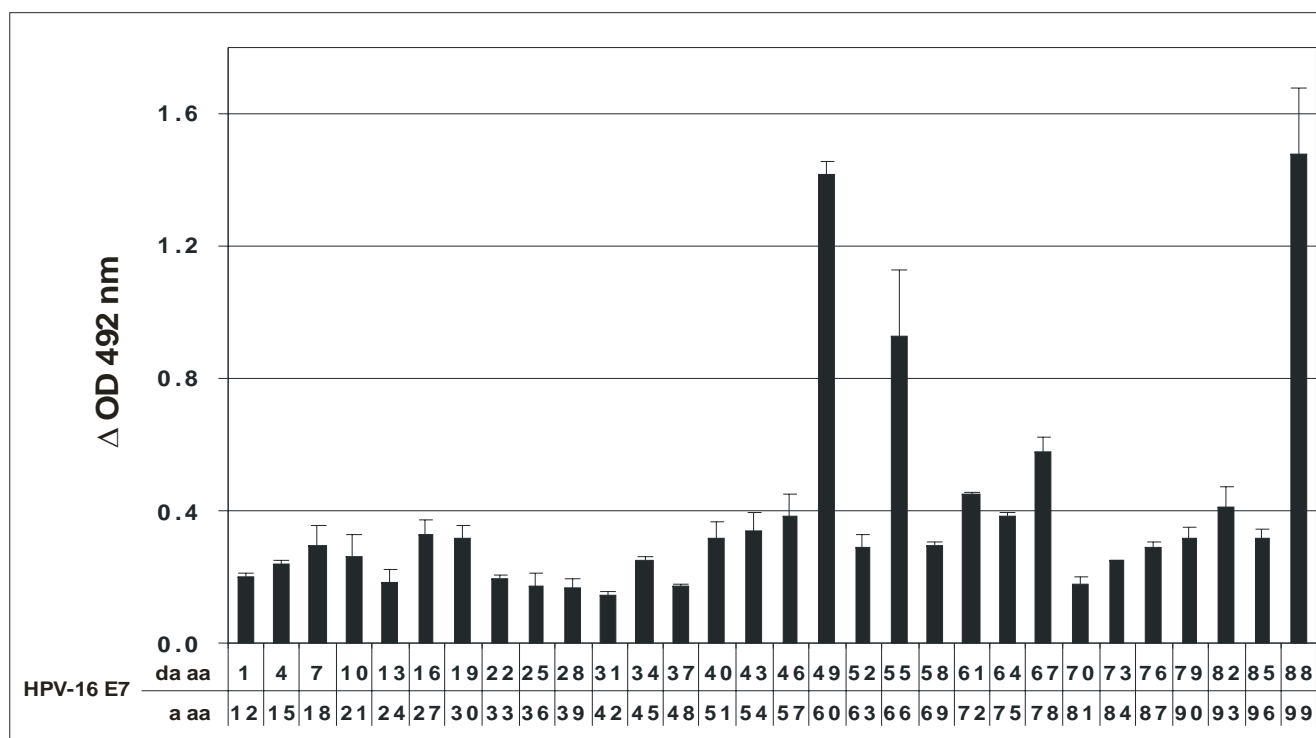
### **4.1 Identificazione della zona d'interazione di E7 HPV-16 e GSTP1**

Allo scopo di individuare in dettaglio le sequenze aminoacidiche dell'oncoproteina E7 che interagiscono con la GSTP1 è stata utilizzata la tecnica di sintesi di oligopeptidi in fase solida (Mimotopes) che prevede la sintesi su supporti di polipropilene (pin) di oligopeptidi (Geysen et al., 1984; Maeji et al., 1990) la cui sequenza riproduce l'intera oncoproteina E7 (98aa). Tali oligopeptidi sono stati sintetizzati come dodecameri, dove l'oligopeptide "n+1" condivide 9 aminoacidi con l'oligopeptide "n". La sovrapposizione di sequenze impedisce che la regione di legame di E7 con GSTP1 sia frammentata su troppi oligopeptidi.

Terminata la sintesi su fase insolubile (pin), gli oligopeptidi sono stati saggiati per la loro abilità di interagire fisicamente con la proteina ricombinante GSTP1. La quantità di GSTP1 legata da ogni singolo pin è stata quantificata tramite saggio immunoenzimatico (ELISA).

I risultati, riportati nella figura 7, mostrano che due regioni coinvolte nel legame: una in posizione centrale e l'altra nella regione C-terminale della sequenza aminoacidica di E7. Queste due regioni sono localizzate nel dominio "zinc finger" CR3. E' noto che questa regione interagisce con alcuni fattori coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, nel metabolismo dei carboidrati e nella regolazione trascrizionale (Zwerschke e Jansen-Durr, 2000) ed è necessaria per la capacità trasformante di E7 (Mc Cance, 2005).

Lo stesso esperimento di legame su oligopeptidi sintetici è stato ripetuto in presenza di glutathione ridotto (GSH) al fine di verificare se il legame GSTP1-E7 venga influenzato o meno dalla presenza del cofattore naturale di GSTP1. Il pattern di interazione, in presenza o in assenza di eccesso di glutathione ridotto, è assolutamente sovrapponibile (dati non mostrati), quindi il legame con GSH e la sua azione riducente non inficiano l'interazione tra GSTP1 ed E7.



**Fig. 7. Analisi della zona d'interazione di E7 HPV-16 con la proteina GSTP1.**

Tale grafico mostra il risultato del saggio immunoenzimatico ELISA. Nelle ordinate sono riportati i valori di assorbimento medi (risultato di tre esperimenti indipendenti) rilevati per ciascuna sequenza aminoacidica analizzata. Le due regioni interagenti trovate corrispondono ai picchi di assorbimento del grafico.

## **4.2 Modello molecolare dell'interazione tra il dimero del dominio CR3 di E7 e GSTP1 (docking model)**

In base ai dati ottenuti nel paragrafo 4.1, è stato costruito un modello molecolare dell'interazione tra il dimero del dominio CR3 di E7 HPV-16 (dall'aminoacido 48 al 98 della sequenza di E7) e GSTP1 utilizzando il programma Hex (vedi paragrafo 3.5).

Dopo aver costruito un modello di struttura quaternaria del dimero CR3, è stato effettuato un docking model di quest'ultimo con la struttura tridimensionale, nota in letteratura, della subunità monomerica GSTP1 legata al glutatione (per mostrare il G-site) e al substrato clorambucile (per mostrare il H-site).

I diversi modelli dei complessi CR3 E7 HPV-16/GSTP1 ottenuti dal programma Hex sono stati valutati considerando che la superficie proteica del dominio dimerico CR3 non contiene zone idrofobiche e che il legame del dominio CR3 di E7 HPV-1A (omologo a quello di E7-HPV16) con la proteina pRb dipende in gran parte da interazioni elettrostatiche (Liu et al., 2006). Infine, è stato scelto il complesso caratterizzato dal maggior numero di interazioni elettrostatiche intermolecolari (fig. 8A). Per il dimero CR3 è stata scelta una visualizzazione della struttura per mettere in evidenza lo scheletro proteico; per quanto riguarda GSTP1, una che rappresenta la superficie proteica (in azzurro nella figura).

In rosso sono evidenziati gli aminoacidi del dominio CR3 che interagiscono con GSTP1. È interessante notare che questi aminoacidi (tra i quali Glu80, His 51 e Arg66) fanno parte del peptide con maggiore positività al saggio ELISA per l'interazione con GSTP1 (vedi paragrafo 4.1). Nella tabella sottostante, sono elencati i ponti salini intermolecolari che potrebbero formarsi tra aminoacidi polari delle due proteine, interazioni necessarie per lo stabilirsi del legame tra il CR3 e la GSTP1.

<b>GSTP1</b>	<b>E7 HPV-16</b>
Lys 44	Asp 62
Arg 70	Glu 80
Arg 74	Glu 80
Asp 90	His 51
Asp 94	Arg 66

Come si vede nel modello, il legame con E7 non causa alcun ingombro sterico sui residui che costituiscono il sito attivo dell'enzima: il sito di legame per il glutatione, G-site, e il sito di legame per il substrato, H-site. Ciò conferma i dati ottenuti col saggio immunoenzimatico del paragrafo 4.1, dove un eccesso di glutatione non inficia la possibilità degli oligopeptidi di E7 di interagire con GSTP1.

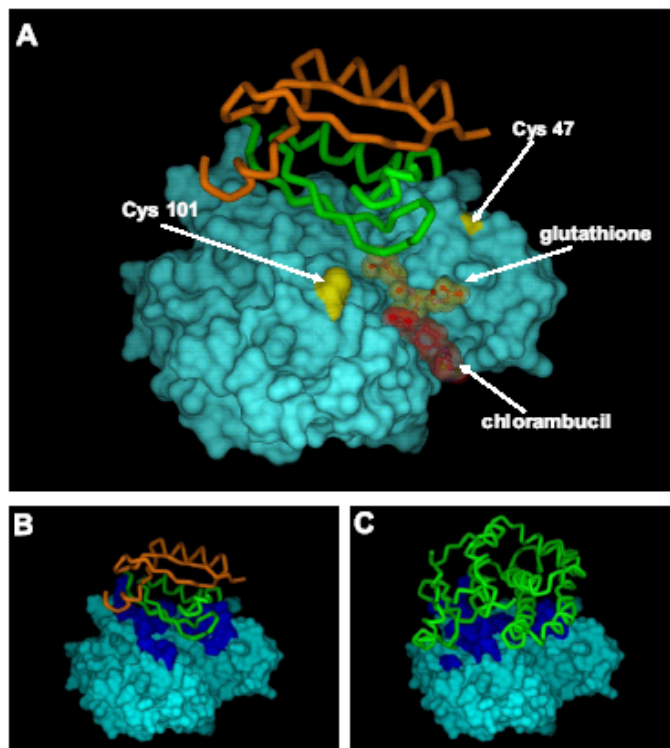
Inoltre, GSTP1 sembra legare soltanto uno dei dimeri di CR3, lasciando così l'altro dominio CR3 potenzialmente in grado di poter legare un altro monomero di GSTP1.

In giallo sono riportati i residui aminoacidici di cisteina 47 e 101 della GSTP1. Tali residui devono stare in uno stato ridotto affinché la proteina risulti attiva, sia dal punto di vista catalitico che da quello regolatorio (vedi paragrafo 1.2.2). Secondo questo modello, il dimero di E7, legandosi a GSTP1, va a interporsi tra questi due residui causando un ingombro sterico che non rende possibile la formazione del ponte disolfuro intramolecolare tra le due cisteine e/o intermolecolare con un altro monomero di GSTP1, impedendo, quindi, l'ossidazione di tali residui.

Nella figura 8B, è visualizzato il modello evidenziando in blu l'intera regione di legame della GSTP1 sul dominio CR3 di E7 HPV-16.

Nella figura 8C, è riportata, invece, la struttura tridimensionale dell'enzima GSTP1 nativo in forma dimerica (Protein Data Bank structure 1AQW), evidenziando in blu l'interfaccia di legame di un monomero sull'altro.

Confrontando le regioni blu delle figure B e C, si nota che in molte zone del monomero GSTP1 vi è una sovrapposizione. Secondo il modello, vi sarebbe una competizione di legame mutuamente esclusiva tra E7 e il monomero di GSTP1. E7, legato a un monomero di GSTP1, impedirebbe stericamente il legame di un altro monomero di GSTP1.



**Fig. 8. Modello molecolare dell'interazione tra il dimer del dominio CR3 di E7 HPV-16 e la subunità monomerica GSTP1.**

**A)** Modello “docking” del monomero GSTP1 (viene rappresentata la superficie della proteina, in azzurro) con il dimer CR3 di E7 HPV-16 (rappresentato come “scheletro proteico” con le due subunità distinte tramite colori verde e arancione). La porzione della GSTP1 dove si trovano localizzati i residui di Cys 47 e 101 è evidenziata in giallo. Per ottenere la struttura tridimensionale di GSTP1, tale monomero è stato co-cristallizzato con il suo cofattore, il glutathione, e con un potenziale substrato, il clorambucile, per mostrare, rispettivamente, il G-site e il H-site dell'enzima.

**B)** Altra rappresentazione del modello docking. In blu è evidenziata la porzione proteica del monomero di GSTP1 che interagisce col CR3 di E7 HPV-16.

**C)** Struttura tridimensionale dell'omodimero GSTP1. In blu è evidenziata la regione di contatto di un monomero con l'altro.

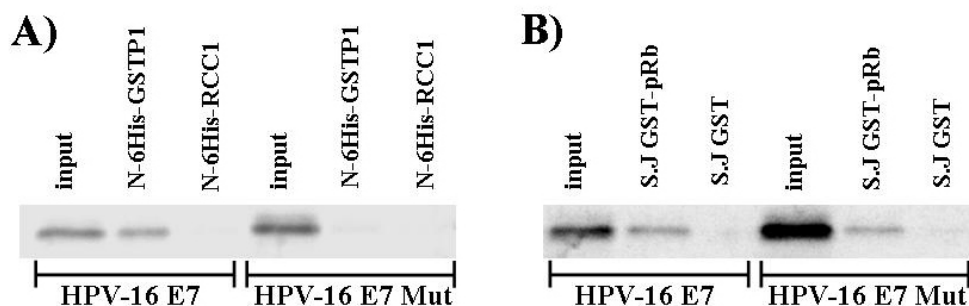
### 4.3 Mutagenesi sito-specifica della proteina E7

Secondo i dati sperimentali riportati nel paragrafo 4.1 e il modello molecolare d'interazione (paragrafo 4.2), specifici aminoacidi lungo la sequenza di E7 svolgono un ruolo essenziale per il legame con il monomero di GSTP1. Questi aminoacidi sono riassunti nella tabella del paragrafo 4.2. Sulla base di questi dati, sono state introdotte, mediante PCR, specifiche sostituzioni nucleotidiche a carico della sequenza di E7 HPV-16 con lo scopo di ottenere un mutante E7 HPV-16 che non legghi GSTP1. La proteina tradotta *in vitro* porta sostituzioni aminoacidiche nei tre aminoacidi coinvolti, secondo il modello molecolare, nel legame con GSTP1: precisamente His 51, Glu 80 e Arg 66. Questi residui sono stati sostituiti ciascuno con un residuo di Ala.

Sia la proteina E7 HPV-16 wild-type che quella mutata (E7 HPV-16 Mut) sono state prodotte *in vitro*, marcate radioattivamente e saggiate per l'interazione *in vitro* con una proteina GSTP1 ricombinante legata ad un supporto solido. La separazione elettroforetica e la conseguente esposizione autoradiografica mostra che soltanto la proteina E7 HPV-16 wild-type è in grado di interagire con la GSTP1 (fig. 9A). Il saggio d'interazione *in vitro* è stato effettuato anche con una proteina, RCC1, che non lega E7 HPV-16 e rappresenta il controllo negativo.

Si può affermare che le mutazioni introdotte, scelte sulla base del modello molecolare, inficiano in modo determinante *in vitro* il legame di E7 con la GSTP1. Interessante notare che queste mutazioni, che causano una “perturbazione molecolare” locale nella struttura tridimensionale della proteina, non interferiscono con l'abilità di E7 di interagire con la proteina cellulare pRb, il più noto target molecolare di E7. Infatti, è stato effettuato un esperimento di interazione *in vitro* utilizzando la proteina ricombinante pRb e, come si vede nel pannello B della figura 9, E7 HPV-16 Mut, al pari di E7 HPV-16 wild-type, mantiene la capacità di legare pRb.





**Fig. 9. Saggi per l'analisi dell'interazione *in vitro***

- A) La proteina ricombinante (N-6His-GSTP1 o N-6His-RCC1, quest'ultimo è un controllo negativo), legata ad un supporto solido, è stata incubata in presenza del tradotto *in vitro* [ $^{35}$ S]-E7 HPV16 o [ $^{35}$ S]-E7 HPV16 Mut con successiva separazione elettroforetica ed esposizione autoradiografica. Il segnale radioattivo è presente solamente nel campione con GSTP1 e [ $^{35}$ S]-E7 HPV16.
- B) La proteina ricombinante S.J.GST-pRb, legata ad un supporto solido, è stata incubata in presenza del tradotto *in vitro* [ $^{35}$ S]-E7 HPV16 o [ $^{35}$ S]-E7 HPV16 Mut con successiva separazione elettroforetica ed esposizione autoradiografica. Il segnale radioattivo è presente in entrambi i campioni, a dimostrazione dell'avvenuta interazione di entrambe le proteine E7 con pRb. Il segnale radioattivo è assente nel controllo negativo (la proteina S.J.GST).

#### **4.4 Analisi dell'espressione e dell'attività enzimatica di GSTP1 in cellule HaCaT infettate con E7**

Per investigare sul possibile significato biologico e funzionale dell'interazione fisica tra la proteina cellulare GSTP1 e l'oncoproteina virale, sono stati prodotti cloni cellulari HaCaT (cheratinociti umani immortalizzati) in grado di esprimere stabilmente E7 di HPV-16 tramite costrutti retrovirali. La scelta di utilizzare cellule infettate al posto di cellule trasfettate transientemente nasce dalla necessità di ottenere una popolazione cellulare che esprima stabilmente le proteine virali in modo omogeneo e a livelli paragonabili a quelli riscontrabili nelle cellule di carcinoma della cervice infettate da HPV, dove si osserva una produzione bassa e costante della proteina virale.

L'espressione delle proteine E7 HPV-16 wild-type e E7 HPV-16 Mut in cellule HaCaT infettate è stata verificata attraverso Western blotting utilizzando anticorpi specifici per la sequenza HA della proteina di fusione E7 infettata (fig. 10A).

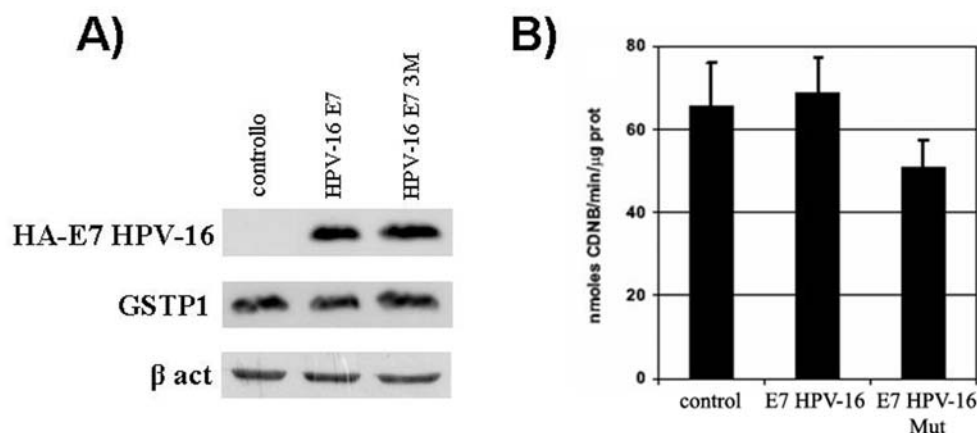
Il controllo è rappresentato da cellule HaCaT infettate col solo costrutto retrovirale vuoto. Questo clone cellulare rappresenta la condizione di riferimento per ogni valutazione dell'effetto di E7 nella cellula infettata. L'infezione effettuata per ottenere l'espressione della proteina E7 HPV-16 Mut consente un'importante verifica del possibile significato biologico dell'interazione tra E7 e GSTP1, che rappresenta lo scopo di questa tesi.

Ottenuti dei cloni cellulari che esprimono stabilmente la proteina ectopica, è stato verificato se la presenza di E7 sia in grado di alterare l'espressione e l'attività di GSTP1.

Il livello traduzionale di GSTP1 è stato valutato effettuando esperimenti di Western blotting su lisati proteici cellulari dei tre cloni infettati. Come si vede nella figura 10A, non vi è alcuna differenza d'intensità di segnale fra i tre lisati, a dimostrazione che i livelli proteici di GSTP1, nonostante la

presenza di E7, restano inalterati. Lo stesso risultato è stato ottenuto valutando, mediante real time PCR, i livelli di mRNA di GSTP1 (dato non mostrato).

GSTP1 svolge un'importante funzione enzimatica all'interno della cellula (paragrafo 1.2.2). Quindi, è stata determinata anche l'attività catalitica di GSTP1 in relazione alla presenza o meno delle proteine virali analizzate. Per valutare più accuratamente la modulazione dell'attività enzimatica della GSTP1 rispetto a quella totale delle GST presenti nella cellula, l'attività enzimatica è stata determinata in presenza e in assenza di acido etacrinico (EA), un inibitore della GSTP1 (Awasthi et al. 1993). Per sottrazione tra le due misurazioni effettuate è stato possibile evidenziare l'attività glutathione S-tranferasica a carico della sola GSTP1. Nel grafico della figura 10 (pannello B), sono riassunte le misurazioni effettuate in tre esperimenti indipendenti. Si nota un leggero aumento dell'attività enzimatica nelle cellule infettate con E7 HPV-16 e un decremento in quelle infettate con E7 HPV-16 Mut, se comparate con l'attività di GSTP1 presente nelle cellule di controllo. Queste variazioni, però, non risultano essere statisticamente significative e, quindi, possono esprimere o soltanto una “tendenza biologica” o una fluttuazione statistica casuale dei dati (“ipotesi nulla”).



**Fig. 10. Analisi dei livelli proteici e di attività enzimatica di GSTP1 in cellule HaCaT infettate con E7.**

A) Western blotting effettuato sui tre cloni cellulari infettati prodotti (infezione con il solo costrutto retrovirale, denominato “controllo”, con HA-E7 HPV-16 e con HA-E7 HPV-16 Mut) utilizzando anticorpi specifici per l’epitopo HA (per verificare la traduzione della proteina virale ectopica introdotta), per la GSTP1 e per la β-actina, usata per la normalizzazione dei risultati.

B) Il grafico rappresenta l’attività enzimatica a carico della GSTP1 cellulare nei tre cloni cellulari infettati. L’attività è espressa come nmoli di CDNB/min/mg di proteina e i valori sono stati ottenuti per sottrazione tra le misurazioni effettuate in assenza e in presenza di acido etacrinico, un inibitore della GSTP1.

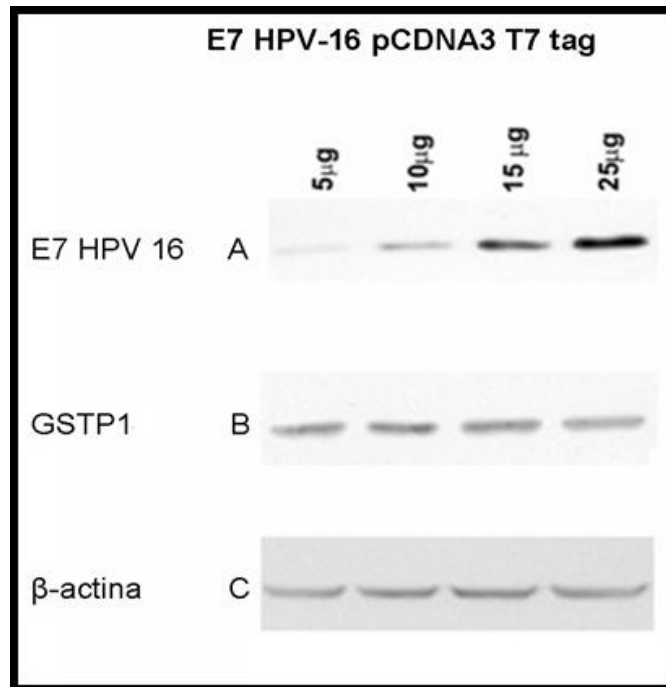
Le colonne mostrano il valore medio  $\pm$  deviazione standard (esperimenti effettuati in triplicato).

#### **4.5 Analisi dei livelli proteici di GSTP1 in cellule Phoenix trasfettate in modo transiente con E7**

L'infezione retrovirale consente l'espressione stabile del gene ectopico introdotto, ma a bassi livelli proteici; viceversa, la trasfezione transiente consente l'espressione transitoria del gene ectopico ottenendo però livelli proteici più elevati.

Per verificare ulteriormente se l'espressione di E7 HPV-16 non alterasse i livelli proteici della GSTP1 cellulare, sono stati effettuati esperimenti di espressione ectopica a livelli crescenti di E7. Per ottenere un'elevata efficienza di trasfezione e un ottimo livello di espressione di E7 è stata utilizzata la linea cellulare Phoenix ( $\Phi$ NX) (Kinsella and Nolan, 1996).

Le cellule Phoenix sono state trasfettate in modo transiente con concentrazioni crescenti (5, 10, 15 e 25  $\mu$ g) del plasmide E7 HPV-16 pCDNA3T7tag oppure del plasmide pCDNA3T7tag senza l'inserto (controllo). Trascorse 48h, sono stati controllati, mediante Western blotting, i livelli proteici di E7 e GSTP1 prodotti dalle cellule. Come si vede nella figura 11, a quantità crescenti di E7 non corrisponde una modulazione dei livelli proteici di GSTP1, i quali si mantengono relativamente stabili.



**Fig. 11. Analisi dei livelli proteici di GSTP1 in relazione a livelli di espressione ectopica crescenti di E7 HPV-16.**

- A) Verifica, mediante Western blotting, dei livelli di espressione ectopica crescenti di E7 HPV-16 pCDNA3T7tag in cellule Phoenix.
- B) Livelli proteici di GSTP1 presenti nei campioni analizzati.
- C) Livelli proteici di  $\beta$ -actina, necessari per la normalizzazione dei dati ottenuti.

#### **4.6 Alterazioni nell'equilibrio redox cellulare in presenza di E7**

Il mantenimento dell'equilibrio cellulare redox è una delle principali funzioni di GSTP1. Quindi, dopo aver valutato l'attività enzimatica di GSTP1 in presenza di E7, sono stati analizzati una serie di parametri biochimici per stimare quantitativamente se la presenza di E7, wild-type o mutata, interferisce sull'equilibrio redox cellulare.

Nei tre cloni cellulari infettati, sono stati analizzati i seguenti parametri biochimici: 1) la quantità di “sostanze reattive all'acido tiobarbiturico” (TBARS) che rappresentano il prodotto finale della perossidazione lipidica; 2) il contenuto degli acidi grassi poli-insaturi (PUFAs) che rappresentano il primo target dello stress lipidico cellulare; 3) l'attività enzimatica della superossido dismutasi (SOD), della catalasi e della glutazione perossidasi (GSH-Px); 4) la quantità di glutazione ridotto (GSH), importante per la rimozione dei radicali liberi. I risultati sono riassunti nella tabella della figura 12.

Vi è una variazione, statisticamente significativa, in tutti i parametri analizzati nelle cellule infettate con E7 HPV-16 se confrontate con quelle di controllo. Tali differenze evidenziano un maggiore stress ossidativo cellulare causato dalla presenza di E7 HPV-16.

Analizzando i dati ottenuti sul clone HaCaT infettato con E7 HPV-16 Mut e comparandoli con quelli delle cellule di controllo, si nota anche qui una tendenza verso l'aumento dello stress ossidativo causato dalla presenza della proteina virale. In particolare, l'attività della glutazione perossidasi e il contenuto del glutazione ridotto (GSH) risultano aumentate in entrambe le linee infettate con le proteine virali.

	<b>Parametri</b>	<b>Controllo</b>	<b>HPV-16 E7</b>	<b>HPV-16 E7 Mut</b>
<b>Perossidazione lipidica</b>	TBARS (nmol/mg prot.)	0.37 ± 0.01	0.71 ± 0.04**	0.42 ± 0.09 <sup>◇</sup>
	PUFA (%)	25.36 ± 0.41	22.92 ± 0.91*	23.76 ± 0,83
<b>Equilibrio redox citosolico</b>	SOD (U/mg prot.)	31.91 ± 2.05	38.29 ± 2.01*	37.92 ± 1.09*
	Catalase (U/mg prot.)	6.33 ± 0.85	7.45 ± 1.01*	8.52 ± 0.93*
	GSH-Px (mU/mg prot.)	0.56 ± 0.03	0.85 ± 0.03**	0.74 ± 0.02** <sup>◇</sup>
	GSH (nmol/mg prot.)	193.53 ± 2.74	235.67 ± 19.85*	240.00 ± 18.73*

**Fig. 12. La presenza di E7 causa stress ossidativo nella cellula infettata.**

Nella tabella sono riportate le determinazioni quantitative (3 determinazioni indipendenti effettuate in duplicato ed espresse come media ± SEM) dei parametri analizzati per stimare l'equilibrio redox nei tre cloni cellulari HaCaT infettati.

Nelle colonne riguardanti il clone cellulare infettato con E7 HPV-16 o con E7 HPV-16 Mut, l'asterisco (\*) indica la significatività statistica ottenuta confrontando i loro valori con quelli delle cellule di controllo. Nelle colonne riguardanti il clone cellulare infettato con E7 HPV-16 Mut, il simbolo del diamante (◇) indica la significativa statistica ottenuta confrontando i suoi valori con quelli delle cellule infettate con E7 HPV-16.

Come si vede dai dati, vi è un generale aumento dello stress ossidativo cellulare causato dalla presenza della proteina virale, sia nella forma wild-type che in quella mutata.



#### **4.7 Analisi dell'influenza di E7 sull'attività regolatoria di GSTP1**

Dopo aver constatato che la presenza di E7 nella cellula e il legame di E7 con GSTP1 non interferisce col ruolo catalitico cellulare di GSTP1 (paragrafo 4.4), è stato analizzato, nei cloni cellulari HaCaT infettati, l'altro importante ruolo svolto da GSTP1: è in grado di inibire la fosforilazione e, conseguentemente, l'attivazione di JNK1 (c-Jun N-terminal Kinase 1), con il risultato di un'inibizione della cascata apoptotica mediata da quest'ultima (Adler et al.1999; Wang et al. 2001). GSTP1 lega JNK1 solo nella sua forma monomerica ridotta; tale legame inibisce la fosforilazione di JNK1. Condizioni di stress possono portare all'ossidazione e, di conseguenza, alla completa inattivazione della proteina GSTP1 (Shen et al., 1993; Bernardini et al., 2000; Cumming et al, 2001; Chang et al., 2001; Wang et al., 2001). Dato che E7 provoca un aumento della sopravvivenza cellulare (Severino et la., 2007), è stato analizzato se il legame di E7 con la GSTP1 possa causare un'alterazione del pathway regolatorio svolto dalla forma monomerica ridotta di GSTP1. Sono stati valutati possibili variazioni nei livelli di ossidazione della GSTP1 e nel livello di fosforilazione di JNK1 indotti entrambi dalla presenza di E7 HPV-16.

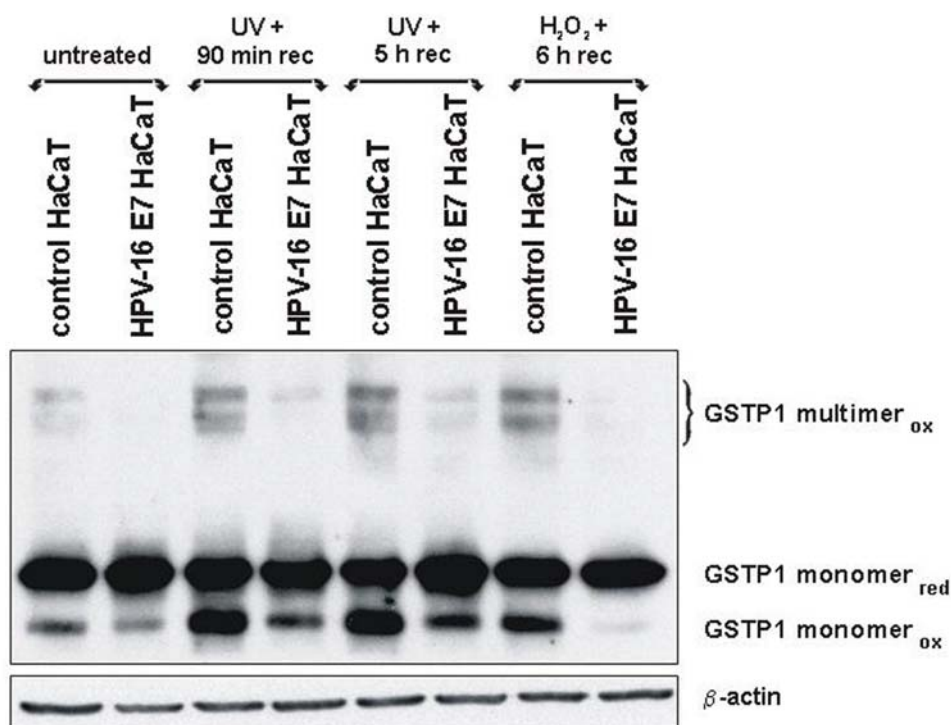
##### **4.7.1 Protezione dall'ossidazione di GSTP1 nelle cellule infettate con E7**

Lisati proteici totali sono stati analizzati mediante Western blotting per determinare i livelli proteici delle forme ossidate e ridotte della proteina GSTP1. Effettuando un Western blotting in assenza di  $\beta$ -mercaptoetanolo (condizioni non riducenti), è mantenuto inalterato lo stato redox della proteina così come è all'interno della cellula: in tal

modo è possibile separare elettroforeticamente la forma ossidata da quella ridotta della proteina GSTP1 (Ricci et al., 1991; Shen et al., 1993; Chang et al., 2001; Cumming et al., 2001). La figura 13 mostra il Western blotting ottenuto.

In condizioni normali (“untreated”), si nota una leggera diminuzione dell’ossidazione della proteina GSTP1, sia nelle forme multimeriche che monomerica, in presenza di E7 HPV-16. Se viene indotto stress ossidativo, tramite irradiazione con UV o trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, si assiste a un sostanziale incremento delle forme ossidate di GSTP1. Infatti, gli esperimenti effettuati con il controllo (HaCaT infettate col solo vettore vuoto), mostrano che vi è un notevole aumento sia delle forme multimeriche che monomerica ossidate della GSTP1 dopo induzione dello stress ossidativo.(vedi fig. 13). Ciò conferma i dati in letteratura (vedi paragrafo 1.2.2).

Molto interessante notare che, in queste condizioni, appare più evidente l’effetto di E7 sulla protezione dall’ossidazione di GSTP1. In particolare vi è una netta diminuzione dei livelli del monomero ossidato, generato dalla formazione del legame disolfuro intramolecolare tra la cys 47 e la cys 101 (Ricci et al., 1991; Cumming et al., 2001).

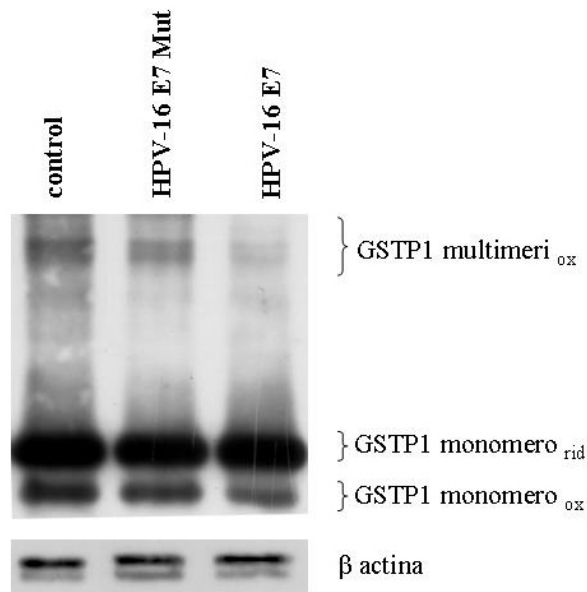


**Fig. 13. E7 HPV-16 influenza il bilancio tra forma ossidata e ridotta della GSTP1.**

Western blotting effettuato in condizioni non riducenti (assenza di  $\beta$ -mercaptoetanolo) per mantenere inalterato lo stato redox della GSTP1 nei lisati cellulari delle HaCaT di controllo e di quelle infettate con E7 HPV-16. Tali cellule sono state analizzate in condizioni normali (“untreated”) e dopo induzione di stress ossidativo tramite esposizione agli UV (UVB,  $5 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  per 1 minuto) o a perossido d’idrogeno ( $0.5 \text{ mM H}_2\text{O}_2$  for 30 min). Trascorsi 90 minuti o 5h (nel caso dell’esposizione agli UV) o 6h (nel caso del trattamento con perossido d’idrogeno), le cellule sono state lisate ed è stata saggiata la quantità di GSTP1 ossidata e ridotta mediante Western blotting.

La presenza di E7 HPV-16 causa una drastica diminuzione dell’ossidazione di GSTP1, sia della forma multimerica (GSTP1 multimer<sub>ox</sub>) e sia di quella monomerica (GSTP1 monomer<sub>ox</sub>). I livelli proteici di actina, determinati effettuando un Western blotting dei lisati in condizioni riducenti, sono stati utilizzati per la normalizzazione dei dati.

Effettuando Western blotting in condizioni non riducenti, dopo induzione di stress ossidativo, si nota, nel clone cellulare infettato con E7 HPV-16 Mut, che tale proteina virale mutata è meno efficiente nella protezione dell'ossidazione di GSTP1, se paragonata agli effetti ottenuti da E7 wild-type (fig. 14). Questa minore protezione può essere interpretata sulla base della minore affinità di E7 HPV-16 Mut verso GSTP1; E7 HPV-16 Mut non è, quindi, in grado di impedire stericamente (secondo il modello molecolare del paragrafo 4.2) la formazione dei legami disolfuro a carico della proteina GSTP1 (in particolare, quello tra cys 47 e cys 101).



**Fig. 14. E7 HPV-16 Mut è meno efficiente nella protezione dall'ossidazione di GSTP1.**

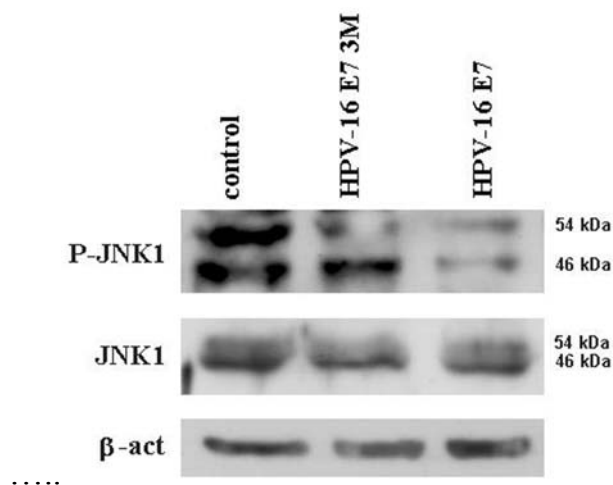
Western blotting effettuato in condizioni non riducenti, dopo induzione di stress ossidativo (tramite irradiazione con UVB, 5 mJ/ cm<sup>2</sup> per 1 minuto).

Trascorse 5h dopo l'esposizione agli UV, le cellule (dei tre cloni cellulari infettati) sono state lisate ed è stata valutata la quantità di GSTP1 ossidata e ridotta. I livelli proteici di β-actina, determinati nelle stesse condizioni di Western blotting, sono stati utilizzati per la normalizzazione dei dati.

#### 4.7.2 La presenza di E7 causa una diminuzione dei livelli di fosforilazione di JNK1

Sono stati valutati i livelli di fosforilazione della proteina JNK1 nei tre cloni cellulari infettati. Per valutare un'eventuale modulazione da parte di E7, è stata indotta, attraverso irradiazione con UV, l'attivazione della cascata pro-apoptotica regolata da JNK1. I risultati sono rappresentati nella figura 15.

Le cellule HaCaT che esprimono E7 HPV-16 mostrano, rispetto al controllo, una marcata riduzione della forma fosforilata di JNK1, come rilevato dal Western blotting effettuato usando uno specifico anticorpo che riconosce i livelli endogeni delle forme p46 e p54 di JNK1 (entrambe fosforilate a livello della treonina 183 e della tirosina 185). Le cellule infettate con E7 HPV-16 Mut mostrano un livello di fosforilazione della proteina intermedio tra il controllo e E7 HPV-16 wild-type. Ciò dimostra che la proteina virale mutata è meno efficiente nel determinare un abbassamento dei livelli fosforilati di JNK1.



**Fig. 15. Analisi dei livelli di fosforilazione di JNK1.**

Western blotting effettuato sui tre cloni cellulari, dopo induzione con UVB, per valutare il livello di fosforilazione di JNK1, il livello totale di JNK e della β-actina.

#### **4.8 Ruolo di E7 sulla sopravvivenza cellulare in cellule HaCaT e MCF-7**

La presenza di E7 HPV-16 conferisce alle cellule infettate una protezione alla morte cellulare indotta da UV (Magal et al., 1998; Severino et al., 2007). I dati ottenuti nel paragrafo 4.7.2, dimostrano che E7 HPV-16 riesce ad inibire la fosforilazione di JNK1 e conseguentemente l'attivazione del pathway apoptotico.

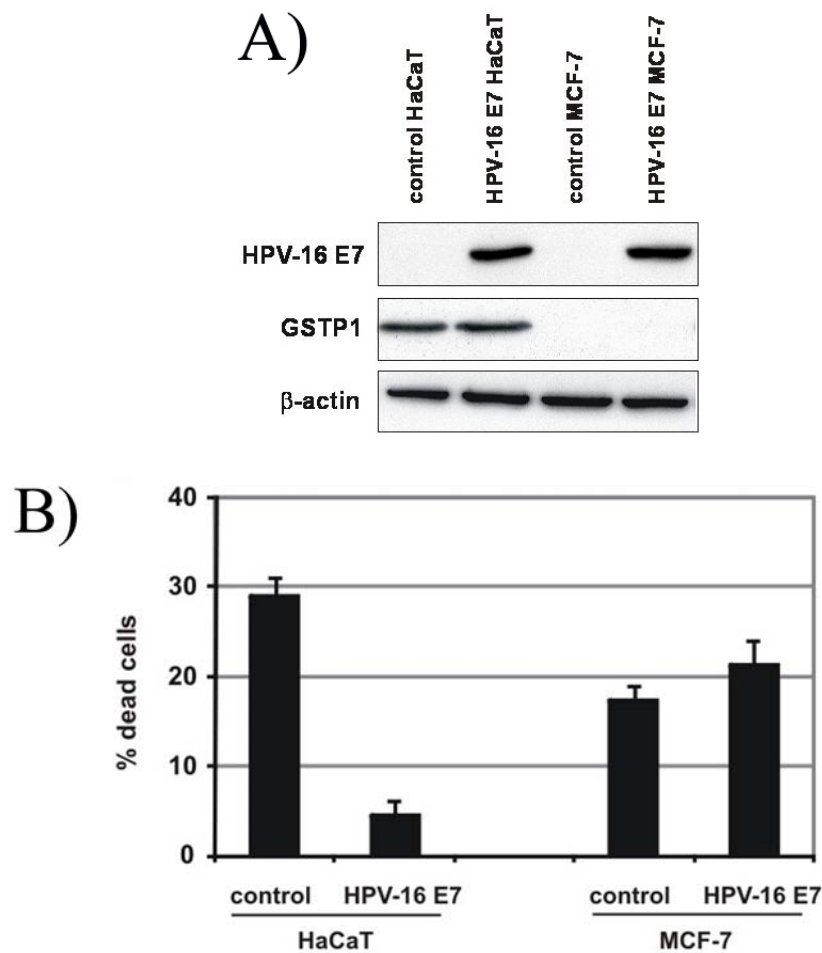
Una verifica di questi dati è stata ottenuta valutando la quantità di cellule resistenti dopo induzione di morte cellulare (trattamento con UV). Cellule HaCaT di controllo o con E7 HPV-16 sono state irradiate con UV e, trascorse 5h dal trattamento, è stata valutata la quantità percentuale di cellule morte tramite una differenza tra numero di cellule vitali non irradiate e numero di cellule vitali irradiate. Come si vede nelle prime due colonne del grafico della figura 16B, vi è una differenza statisticamente significativa nel numero di cellule morte tra HaCaT di controllo e quelle con E7 HPV-16 (rispettivamente,  $28,9 \% \pm 2,3\%$  vs  $4,7 \% \pm 1,5\%$  di morte cellulare).

Prendendo in considerazione la protezione dall'ossidazione di GSTP1 di E7 wild-type e i dati ottenuti con il mutante (paragrafo 4.7), si può ipotizzare che E7 espliciti questo ruolo attraverso il suo legame con GSTP1.

Una prima verifica dell'importanza del legame tra E7 e GSTP1 per l'aumentata sopravvivenza cellulare indotta da E7, è stata ottenuta effettuando lo stesso esperimento di induzione di morte cellulare e successiva conta delle cellule vitali in una linea cellulare che non esprime GSTP1. Le cellule del carcinoma mammario MCF-7 non esprimono GSTP1 (Moscow et al., 1989) a causa di una ipermetilazione del suo promotore (Lin and Nelson, 2003). Come per le HaCaT, sono stati prodotti, tramite infezione retrovirale, un clone per l'espressione stabile di E7 HPV-16 e uno

di controllo nella linea cellulare MCF-7. L'espressione della proteina ectopica introdotta e la mancanza di GSTP1 in tale linea è stata verificata tramite Western blotting (fig. 16A). Nella figura sono riportati anche i livelli proteici di GSTP1 e di E7 HPV-16 nei cloni HaCaT infettati.

I dati quantitativi sulla morte cellulare, dopo trattamento con UV, nei cloni MCF-7 infettati sono riportati nella figura 16B (colonne 3 e 4). Non vi è alcuna differenza quantitativa nel numero percentuale di cellule morte tra MCF-7 di controllo e quelle infettate con E7 HPV-16 (rispettivamente,  $17,4 \% \pm 1,7\%$  vs  $21,4 \% \pm 2,8 \%$ ), a dimostrazione dell'importanza della presenza di GSTP1 nel mediare l'aumentata sopravvivenza cellulare causata da E7.



**Fig. 16.** Determinazione della morte cellulare dopo trattamento con UV in linee cellulari, infettate con E7 HPV-16, che esprimono o meno la GSTP1 (rispettivamente, HaCaT e MCF-7).

**A)** Western blotting effettuato per saggiare la presenza della proteina ectopica (E7 HPV-16) infettata e per verificare l'assenza (linea MCF-7) o presenza (linea HaCaT) della GSTP1 endogena.

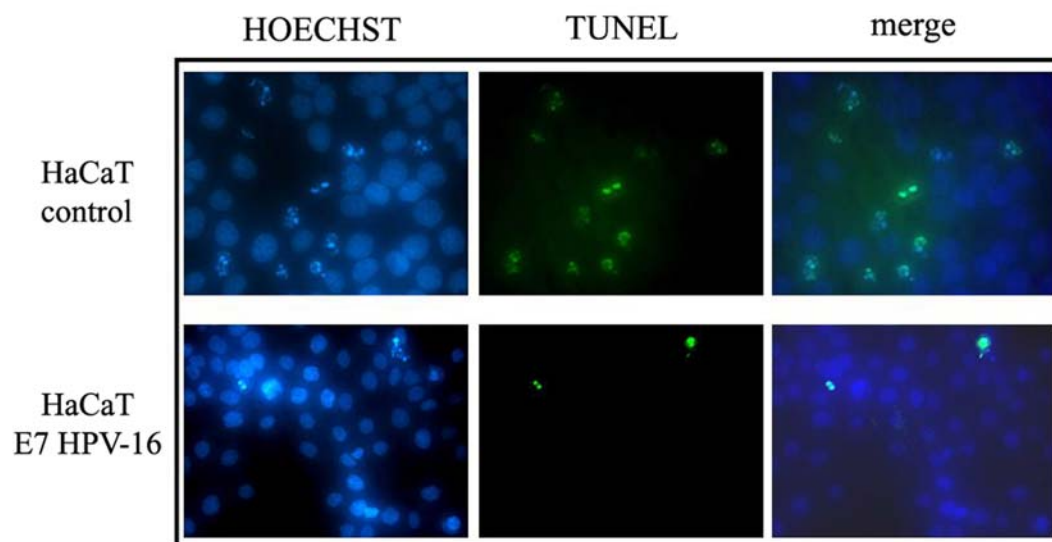
**B)** Cellule infettate con E7 HPV-16 o con il solo vettore retrovirale ("control") sono state irradiate con UV (UVB, 5 mJ/ cm<sup>2</sup> per 1 minuto) e, trascorse 5h dal trattamento, è stata valutata la percentuale di morte cellulare in ciascun clone infettato. Il grafico riassume gli esperimenti di conta effettuati in triplicato nelle due linee cellulari analizzate.



#### **4.9 Visualizzazione dei corpi apoptotici (saggio TUNEL)**

Per verificare e visualizzare l'effettiva differenza di morte tra i due cloni cellulari HaCaT analizzati nel paragrafo 4.8 è stato utilizzato il metodo fluorescente TUNEL (si veda paragrafo 3.17) che permette una colorazione specifica dei corpi apoptotici. Un'aliquota delle cellule sottoposte a conta del paragrafo 4.8, è stata fissata (con paraformaldeide al 3%) su un vetrino e permeabilizzata per consentire l'entrata dell'enzima deossinucleotidil-transferasi terminale (TdT) che, catalizzando una reazione di polimerizzazione del DNA, consente una marcatura dei nuclei soggetti a frammentazione.

Nella figura 17 sono riportate le immagini al microscopio a fluorescenza delle cellule dopo saggio TUNEL, dove i corpi apoptotici appaiono colorati in verde. La colorazione con Hoescht 33342 permette la visualizzazione dei nuclei delle cellule (colorati in blu). Come si vede dalla figura, si osserva una netta differenza nel numero di corpi apoptotici osservati tra le cellule di controllo e cellule infettate con E7 HPV-16 dopo irradiazione con UV.



**Fig 17. Visualizzazione dei corpi apoptotici mediante colorazione TUNEL.**

Nella figura sono riportate immagini di cellule HaCaT dopo colorazione apoptosi-specifica TUNEL (in verde) e colorazione dei nuclei tramite Hoechst 33342 (in blu). La sovrapposizione delle due immagini (merge) consente una migliore visualizzazione del rapporto cellule vive-corpi apoptotici; si osserva una netta differenza in tale rapporto tra i due cloni cellulari analizzati.

#### **4.10 Ruolo di E7 e GSTP1 nella sopravvivenza cellulare dopo irradiazione con UV**

I risultati nel paragrafo 4.8, sebbene ottenuti su una linea cellulare (MCF-7) che non rappresenta il target naturale del virus, sono una prima positiva verifica dell'ipotesi che i meccanismi di sopravvivenza causati dalla presenza di E7 HPV-16 sono mediati in buona parte da GSTP1.

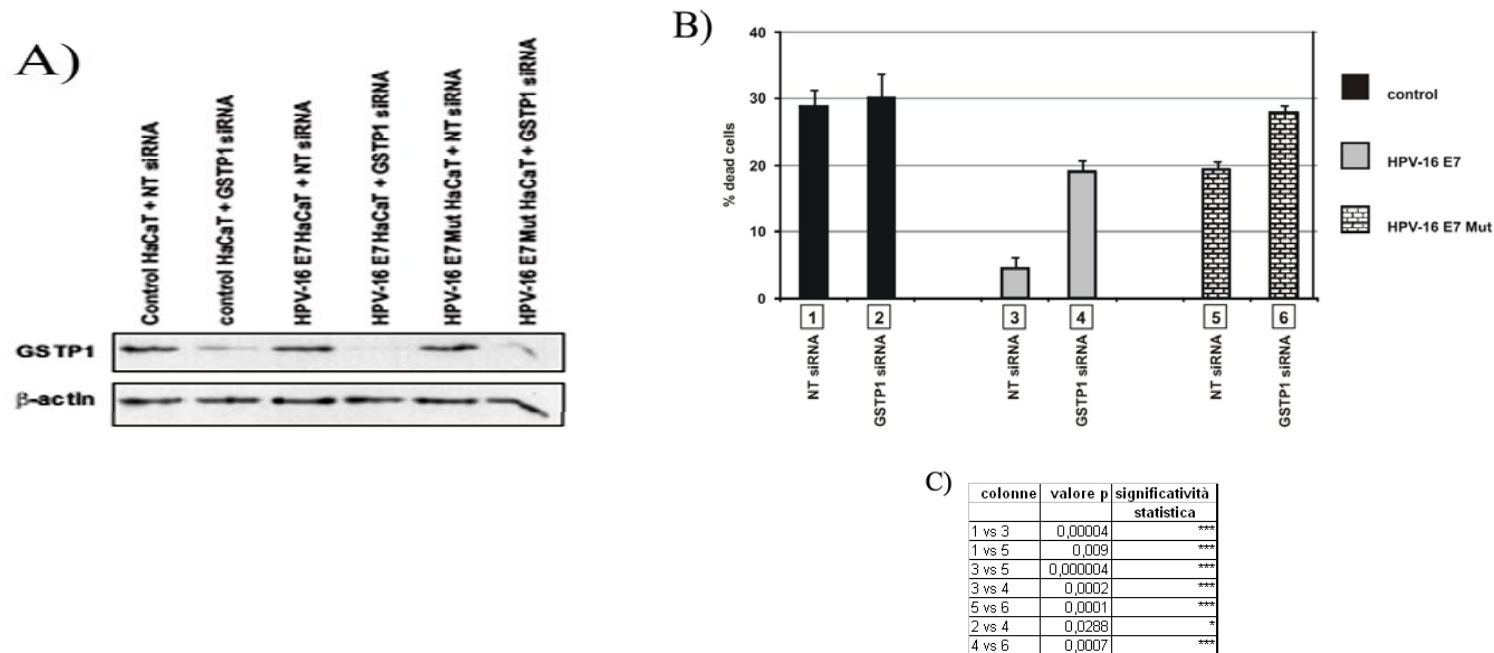
Per verificare ulteriormente quest'ipotesi e per definire più in dettaglio lo specifico ruolo svolto da GSTP1 ed E7 HPV-16 nella sopravvivenza di cellule HaCaT dopo induzione con UV, è stata utilizzata la tecnica di "RNA interference" che permette la degradazione di uno specifico mRNA cellulare attraverso l'introduzione nella cellula di piccole sequenze specifiche di RNA (siRNA). Sono stati utilizzati siRNA per degradare selettivamente mRNA di GSTP1 cellulare nei tre cloni HaCaT infettati. In tal modo è possibile valutare, su cellule HaCaT con GSTP1 silenziato, se E7 HPV-16 sia ancora in grado di modificare la sopravvivenza cellulare dopo induzione con UV.

I tre cloni cellulari sono stati trasfettati con siRNA specifici per la degradazione di GSTP1 (GSTP1 siRNA) e con siRNA di controllo (non targeting siRNA, NT siRNA). Questi ultimi non legano e, quindi, non causano la degradazione di alcun mRNA cellulare. Trascorse 72h, un'aliquota delle cellule è stata lisata e analizzata per l'espressione di GSTP1 mediante Western blotting per quantificare l'efficienza dell'abbassamento dei livelli proteici di GSTP1. Come si vede nella figura 18A, in tutti e tre i cloni è stata ottenuta una buona efficienza di "interference" (intorno al 75-90%, dato ottenuto confrontando, mediante analisi densitometrica, l'intensità del segnale della banda di GSTP1 nel lisato cellulare trasfettato con NT siRNA e quello con GSTP1 siRNA).

Le restanti cellule sono state irradiate con UV e, dopo 5h, è stata effettuata una conta delle cellule vitali. La differenza tra numero di cellule vitali non irradiate e irradiate rappresenta il numero percentuale di cellule morte dopo trattamento con UV (“% dead cell”). Nel grafico della figura 18B, sono riassunti i risultati ottenuti espressi in media  $\pm$  errore standard (SEM). Nelle cellule di controllo trasfettate con NT siRNA e con GSTP1 siRNA, la percentuale di morte risulta essere, rispettivamente, del  $28.9 \pm 2.3\%$  e del  $30.2 \pm 3.6\%$ ; nelle cellule infettate con E7 HPV-16, rispettivamente, del  $4.5 \pm 1.6\%$  e del  $19.0 \pm 1.7\%$ ; nelle cellule infettate con E7 HPV-16 Mut, rispettivamente, del  $19.4 \pm 1.2\%$  e del  $28.1 \pm 1.0\%$ .

L'aumentata sopravvivenza causata dalla presenza di E7 nelle cellule HaCaT, già verificata nel paragrafo 4.8, si osserva confrontando le colonne 1 e 3. Quando nelle cellule infettate con E7 HPV-16 vengono fortemente diminuiti i livelli proteici di GSTP1, si osserva un aumento, statisticamente significativo, della morte cellulare (colonne: 3 vs 4) che testimonia l'importanza della presenza di GSTP1 nel mediare il ruolo antiapoptotico svolto da E7 all'interno della cellula. Gli esperimenti effettuati con le HaCaT infettate con E7 HPV-16 Mut rafforzano tale ipotesi. Tale proteina mutata non ha la stessa efficacia di E7 wild-type nella protezione dalla morte cellulare (colonne: 3 vs 5, differenza statisticamente significativa); questo dato si può interpretare sulla base della difficoltà della proteina virale mutata di legare efficacemente GSTP1. Infatti, quando viene interferita l'espressione di GSTP1 in queste cellule, si assiste ad un annullamento completo della funzione di protezione operata dalla proteina virale (colonne 2 vs 6, differenza non statisticamente significativa).

Questi esperimenti effettuati con la proteina mutata, ci permettono di affermare che il legame tra E7 HPV-16 e GSTP1 è importante per il ruolo anti-apoptotico, tramite inibizione dell'attività di JNK1, svolto da E7 nella cellula infettata.



**Fig. 18. Ruolo di E7 HPV-16, di GSTP1 e della loro interazione nella sopravvivenza cellulare dopo trattamento con UV.**

**A)** Western blotting effettuato nei tre cloni cellulari analizzati per valutare il livello proteico di GSTP1, dopo transfezione con siGSTP1 RNA o con “Non Targeting” siRNA (controllo); **B)** le cellule transfettate vengono esposte ad UV (UVB, 5 mJ/ cm<sup>2</sup> per 1 minuto) ed effettuata una conta vitale. È stata calcolata la differenza nel numero di cellule vitali tra cellule non esposte ed esposte agli UV ed espressa tramite percentuale di morte cellulare (“% dead cells”). Il grafico della figura riassume i risultati (esperimenti effettuati in triplicato ed espressi come media ± SEM); **C)** Nella tabella sono riassunti tutti i dati del grafico B statisticamente significativi (espressi come valore p, calcolati mediante Student’s *t* test, e relativa significatività statistica).

## **5      DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

Le oncoproteine dei piccoli virus a DNA sono potenti “strumenti molecolari” capaci di riprogrammare a vari livelli le funzioni della cellula ospite. La proteina E7 di HPV, nonostante le sue piccole dimensioni (98 aminoacidi), possiede un gran numero di caratteristiche biologiche finalizzate ad assistere la replicazione virale nella cellula ospite. L'espressione persistente di E7 degli HPV cosiddetti “ad alto rischio”, quali HPV-16, nella cellula infettata può favorire la comparsa e la selezione di cloni con elevata propensione alla trasformazione cellulare.

Il ruolo più studiato di E7, e probabilmente anche il più importante, è correlato alla sua capacità di neutralizzare la funzione delle proteine appartenenti alla famiglia RB e, conseguentemente, disaccoppiare la proliferazione dal differenziamento cellulare.

Sono stati dimostrati anche altri meccanismi d'azione di E7 che interferiscono drasticamente con i più importanti processi cellulari; in tal modo, tale oncoproteina favorisce la sopravvivenza, la replicazione del virus e la propensione alla trasformazione cellulare delle cellule infettate (Felsani et al., 2006; Helt e Galloway, 2003; Munger et al., 2001).

Risulta quindi di notevole importanza l'individuazione di nuovi target cellulari di E7 per studiare i processi coinvolti nella trasformazione neoplastica associata all'infezione da HPV.

In questo lavoro sperimentale, è stato valutato il possibile effetto del legame E7 HPV-16/GSTP1 cellulare su entrambi i ruoli funzionali di GSTP1. Sia la funzione enzimatica di GSTP1 nei fenomeni di detossificazione che la sua funzione inibitoria sulla fosforilazione di JNK1 (Adler et al., 1999), possono essere compatibili con un'aumentata sopravvivenza cellulare e con l'inibizione del processo apoptotico, caratteristiche riscontrate nelle cellule

infettate con E7 HPV-16 (si vedano i dati quantitativi di sopravvivenza cellulare e colorazione TUNEL, paragrafi 4.8 e 4.9). La capacità di E7 di legare e di modificare funzionalmente la proteina GSTP1 può portare all'identificazione e la caratterizzazione di un nuovo meccanismo molecolare mediante il quale tale proteina, che rappresenta il principale agente trasformante del virus, favorendo la sopravvivenza di cloni ad alto rischio di trasformazione, è in grado di indurre l'insorgenza di tumori.

Il modello sperimentale scelto per questo studio è stato la linea cellulare di cheratinociti umani immortalizzati (HaCaT). La scelta del tipo cellulare è legata essenzialmente allo spiccato tropismo verso i tessuti epiteliali mostrato in natura dagli HPV.

I livelli proteici e di attività catalitica di GSTP1 non sono modificati né dalla presenza di E7 HPV-16, un risultato in accordo con i precedenti dati di letteratura (Chen and Nirunsuksiri, 1999), né dall'espressione di E7 HPV-16 Mut, la forma mutata della proteina virale con ridotta affinità per GSTP1 che rappresenta un buon modello per verificare se i dati ottenuti in questo lavoro dipendano o meno dal legame di E7 con GSTP1. I livelli proteici di GSTP1 restano inalterati anche quando è stata aumentata, mediante trasfezione, la quantità di E7 nella cellula. Quindi, si può concludere che la presenza di E7 non altera la quantità totale di GSTP1 né la sua attività catalitica.

Oltre all'azione catalitica svolta essenzialmente dalla forma omodimerica di GSTP1, questa proteina, in forma monomerica ridotta, inibisce l'attivazione del pathway apoptotico regolato da JNK1 (Adler et al., 1999). I dati e il modello molecolare d'interazione qui presentati permettono di ipotizzare un meccanismo tramite il quale viene mantenuto attivo tale ruolo regolatorio di GSTP1 mediante l'interazione fisica con E7.

La presenza di E7 causa una forte diminuzione dei livelli fosforilati di JNK1 e, quindi, una minore attivazione del pathway apoptotico JNK1-dipendente. Inoltre, è stato dimostrato che il legame E7 HPV-16/GSTP1

porta ad una diminuzione drastica delle forme ossidate di GSTP1, che inattiverebbe tale proteina. In particolare, E7 diminuisce la quantità di forma monomerica ossidata di GSTP1, permettendo così una stabilizzazione della forma monomerica ridotta la quale inibisce la fosforilazione di JNK1 (Adler et al., 1999). Il concomitante aumento dei livelli di glutathione ridotto cellulare causato dalla presenza di E7, da considerare verosimilmente come risposta allo stress in atto nelle cellule infettate con E7, può agire in modo sinergico nel far aumentare la concentrazione di GSTP1 in forma ridotta.

In condizioni di stress ossidativo, si assiste alla multimerizzazione della GSTP1 tramite formazione di ponti disolfuro intermolecolari che portano all'inattivazione dell'enzima (Adler et al., 1999; Wang et al., 2001; Cumming et al., 2001). Il residuo aminoacidico Cys47 è quello più reattivo nei confronti dei reagenti SH-specifici e sue modificazioni covalenti, quali ponti disolfuro, portano alla perdita dell'attività della GSTP1 (Lo Bello et al., 1990). GSTP1 risulta inattivata se la Cys47 forma un ponte disolfuro intramolecolare con la Cys 101 (Ricci et al., 1991; Shen et al., 1993).

Secondo il modello molecolare dell'interazione E7 HPV-16/GSTP1 presentato in questo lavoro, E7 HPV-16 si interpone tra i residui aminoacidici Cys47 e Cys101 di GSTP1 causando un ingombro sterico che rende impossibile la formazione di un ponte disolfuro intramolecolare tra le due cisteine. Sperimentalmente questa ipotesi è stata verificata: infatti si osserva che E7 causa una forte diminuzione dei livelli di monomero ossidato, indotti dallo stress ossidativo (trattamento con UV o con perossido d'idrogeno).

In base ai dati in silico e sperimentali qui riportati, è possibile ipotizzare che E7 sia in grado di mantenere un pool di molecole di GSTP1 inaccessibile all'attacco ossidativo e, quindi, di creare una riserva di GSTP1 in forma monomerica ridotta, attiva nell'inibizione di JNK1 (fig. 19). Inoltre, secondo tale modello, il legame di E7 con GSTP1 monomero, rende



impossibile il legame con un altro monomero di GSTP1, prevenendo di fatto l'omodimerizzazione della GSTP1 e aumentando così di fatto la concentrazione di GSTP1 in forma monomerica.

Questa ipotesi è confermata dai dati ottenuti esprimendo, in cellule HaCaT, una forma mutata della proteina virale (E7 HPV-16 Mut) che non riesce a legare GSTP1 in modo efficiente. In queste cellule, infatti, sia i livelli di ossidazione di GSTP1 che quelli di fosforilazione di JNK1 risultano più alti se paragonati con quelli ottenuti da cellule HaCaT che esprimono la forma wild-type di E7.

Una valida conferma dell'importante ruolo svolto da GSTP1 nel mediare l'azione anti-apoptotica svolta da E7 viene dai dati sulla sopravvivenza cellulare. Infatti, in cellule mancanti di GSTP1 endogena (cellule MCF-7) e in cellule HaCaT "interferite" per l'espressione di GSTP1 (utilizzo di siRNA specifici), entrambe infettate con E7 HPV-16, si assiste, dopo esposizione UV, ad una drastica diminuzione della sopravvivenza cellulare. Lo stesso risultato si ottiene in cellule HaCaT che esprimono E7 HPV-16 Mut. Un'indicazione indiretta che le differenze riscontrate nei dati di sopravvivenza cellulare dipendono dall'alterazione del pathway regolato da GSTP1 e JNK1, viene dai dati sulla valutazione quantitativa dello stress ossidativo causato dalle proteine virali infettate. Infatti, nelle cellule HaCaT infettate sia con la forma wild-type che mutata di E7, si assiste ad un aumento generico dello stress ossidativo in atto nella cellula (si veda l'aumento dell'attività della glutathione perossidasi e dei livelli di glutathione ridotto) che non trovano riscontro con le differenze di sopravvivenza cellulare riscontrate nelle due linee cellulari infettate.

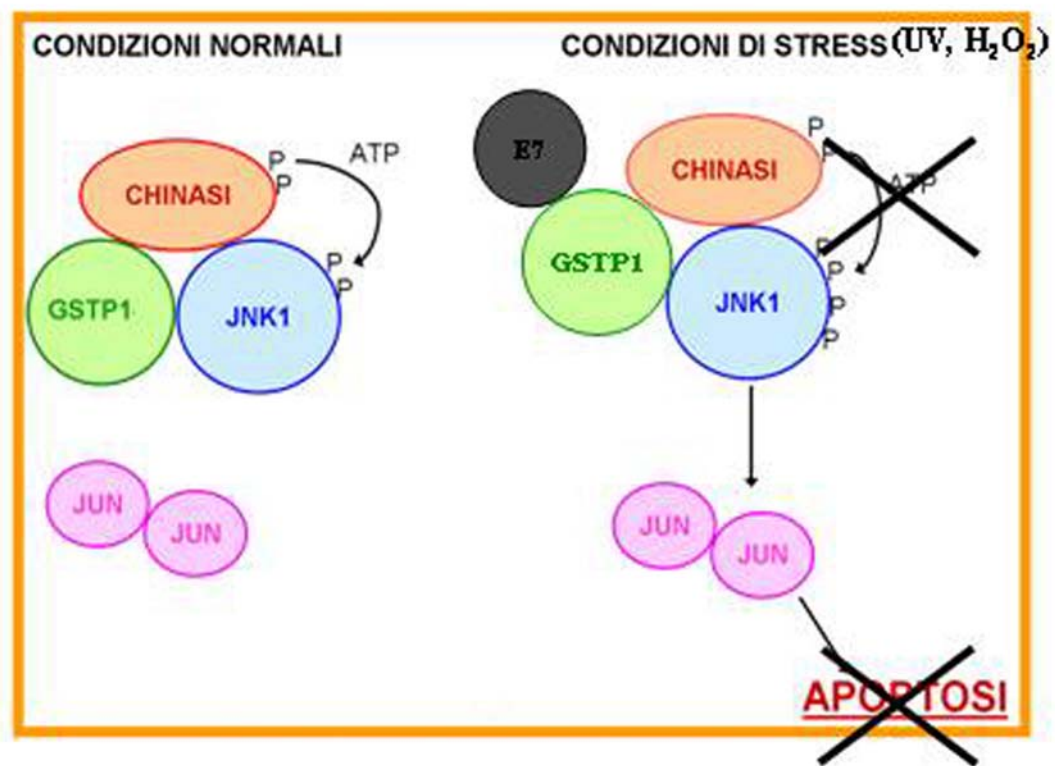
Questi dati permettono di affermare che GSTP1 gioca un ruolo importante nei meccanismi anti-apoptotici svolti da E7, visto che la presenza di entrambe risulta essenziale per garantire tale aumento di sopravvivenza cellulare.

Ci sono delle proteine cellulari che svolgono un ruolo simile ad E7 HPV-16 nel regolare il pathway apoptotico inibito da GSTP1. Ad esempio, la proteina FANCC (Fanconi anemia group C protein) lega GSTP1 e la mantiene nella forma ridotta durante stress ossidativo prevenendo così l'attivazione del processo apoptotico (Cumming et al., 2001). Quindi, E7 HPV-16 sembra mimare tali proteine regolatorie di GSTP1 svolgendo la stessa funzione di prevenzione dell'ossidazione di GSTP1 e, conseguentemente, conferendo alla cellula infettata un vantaggio selettivo in termini di la sopravvivenza cellulare.

Questo lavoro mette, quindi, in evidenza un possibile nuovo meccanismo svolto dalla proteina E7 HPV-16 atto ad aumentare la sopravvivenza cellulare e quindi la sua capacità trasformante. Infatti l'espressione costante di tale proteina virale può: 1) accelerare o indurre l'entrata nel ciclo cellulare (Helt and Galloway 2003; Felsani *et al.* 2006); 2) indurre mitosi aberranti, aumentando così l'instabilità genomica (Duensing *et al.* 2000; Lavia *et al.* 2003); 3) aumentare la sopravvivenza cellulare tramite i meccanismi discussi sopra.

Queste caratteristiche possono agire sinergicamente per favorire l'insorgenza e la successiva selezione di cloni cellulari trasformati che possono portare allo sviluppo di neoplasie (McLaughlin-Drubin and Munger, 2008).

Lo studio di interazioni fisiche delle oncoproteine virali degli HPV ad alto rischio con componenti proteici della cellula ospite rappresenta dunque un importante strumento per ricostruire la complessa rete dei processi provocati da questi virus durante l'infezione e la successiva trasformazione cellulare. Gli elementi chiave di questi processi potranno essere utilizzati in futuro come strumenti molecolari per prevenire e trattare i tumori indotti da virus.



**Fig. 19. Regolazione del processo apoptotico mediato da GSTP1 ed E7.**

Si confronti questo schema con quello della figura 6 (paragrafo 1.2.2). Grazie all'interazione diretta tra E7 e GSTP1, anche in condizioni di stress ossidativi, viene mantenuto un pool di GSTP1 in forma monomerica ridotta. In tale stato, GSTP1 è in grado di legare ed inibire la fosforilazione di JNK1, con conseguente inibizione del processo apoptotico. Con tale meccanismo, E7 aumenta la sopravvivenza cellulare della cellula infettata.

# BIBLIOGRAFIA

Adler V., Yin Z., Fuchs S.Y., Benezra M., Rosario L., Tew K.D., Pincus M.R., Sardana M., Henderson C.J., Wolf C.R. **1999**. Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J.* **18**: 1321-1334.

Adler V. and Pincus M.R. **2004**. Effector peptides from glutathione-S-transferase-pi affect the activation of jun by jun-N-terminal kinase. *Ann Clin Lab Sci.* **34**: 35-46.

Alazawi W., Pett M., Arch B., Scott L., Freeman T., Stanley M.A., Coleman N. **2002**. Changes in cervical keratinocyte gene expression associated with integration of human papillomavirus 16. *Cancer Res.* **62**: 6959–6965.

Ali-Osman F., Akande O., Antoun G., Mao J.X., Buolamwini J. **1997**. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem.* **272**: 10004-12.

Allocati N., Favaloro B., Masulli M., Alexeyev M.F., Di Ilio C. **2003**. *Proteus mirabilis* glutathione S-transferase B1-1 is involved in protective mechanisms against oxidative and chemical stresses. *Biochem J.* **373**: 305-311.

Armstrong R.N. **2000**. Mechanistic diversity in a metalloenzyme superfamily. *Biochemistry* **39**: 13625-13632.

Armstrong R.N. **1997**. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol.* **10**: 2-18.

Awasthi S., Srivastava S.K., Ahmad F., Ahmad H., Ansari G.A. **1993**. Interactions of glutathione S-transferase-pi with ethacrynic acid and its glutathione conjugate. *Biochim. Biophys. Acta* **1164**: 173-178.

Baker C.C., Phelps W.C., Lindgren V., Braun M.J., Gonda M.A., Howley P.M. **1987**. Structural and translational analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol.* **61**: 962–971.

Barbosa M.S., Edmonds C., Fisher C., Schiller J.T., Lowy D.R., Vousden K.H. **1990**. The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1A and SV40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J.* **9**: 153-160.

Bernardini S., Bernassola F., Cortese C., Ballerini S., Melino G., Motti C., Bellincampi L., Iori R., Federici G. **2000**. Modulation of GST P1-1 activity by polymerization during apoptosis. *J Cell Biochem.* **77**: 645-53.

Blacker K.L., Olson E., Vessey D.A., Boyer T.D.. **1991**. Characterization of glutathione S-transferase in cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* **97**: 442-6.

Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Hung J., Markham A., Fusenig N.E. **1988**. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* **106**: 761-771.

Board P.G., Coggan M., Chelvanayagam G., Easteal S., Jermini L.S., Schulte G.K., Danley D.E., Hoth L.R., Griffor M.C., Kamath A.V., Rosner M.H., Chrnyk B.A., Perregaux D.E., Gabel C.A., Geoghegan K.F., Pandit J. **2000**. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol Chem.* **275**: 24798-806.

Boyer S.N., Wazer D.E., Band V. **1996**. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res.* **56**: 4620–4624

Brehm A., Miska E.A., McCance D.J., Reid J.L., Bannister A.J., Kouzarides T. **1998**. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* **391**: 597–601.

Brokaw J.L., Yee C.L., Munger K. **1994**. A mutational analysis of the amino terminal domain of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Virology* **205**: 603-7.

Brooks S.C., Locke E.R., Soule H.D. **1973**. Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem.* **248**: 6251-3.

Cam H. and Dynlacht B.D. **2003**. Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer Cell* **3**: 311–316.

Chang M., Shin Y.G., van Breemen R.B., Blond S.Y., Bolton J.L. **2001**. Structural and functional consequences of inactivation of human glutathione S-transferase P1-1 mediated by the catechol metabolite of equine estrogens, 4-hydroxyequilenin. *Biochemistry* **40**: 4811-20.

Chellappan S., Kraus V.B., Kroger B., Munger K., Howley P.M., Phelps W.C., Nevins J.R. **1992**. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 4549–4553.

Chen C. and Nirunsuksiri W. **1999**. Decreased expression of glutathione S-transferase M1 in HPV16-transfected human cervical keratinocytes in culture. *Carcinogenesis*. **20**: 699-703.

Cheng S., Schmidt-Grimminger D.C., Murant T., Broker T.R., Chow L.T. **1995**. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev.* **9**: 2335–2349.

Cho S.G., Lee Y.H., Park H.S., Ryoo K., Kang K.W., Park J., Eom S.J., Kim M.J., Chang T.S., Choi S.Y., Shim J., Kim Y., Dong M.S., Lee M.J., Kim S.G., Ichijo H., Choi E.J. **2001**. Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biol Chem.* **276**: 12749-55.

Ciccolini F., Di Pasquale G., Carlotti F., Crawford L., Tommasino M.. **1994**. Functional studies of E7 proteins from different HPV types. *Oncogene* **9**: 2633–2638.

Claiborne A. **1985**. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Greenwald R.A. (ed). CRC Press: Boca Raton, FL, pp. 283-284.

Classon M. and Dyson N. **2001**. p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp Cell Res.* **264**: 135-147.

Clemens K.E., Brent R., Gyuris J., Munger K. **1995**. Dimerization of the human papillomavirus E7 oncoprotein *in vivo*. *Virology* **214**: 289–293.

Cobb M.H. **1999**. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol.* **71**: 479-500.

Conger K.L., Liu J.S., Kuo S.R., Chow L.T., Wang T.S. **1999**. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase alpha/primase. *J. Biol Chem.* **274**: 2696–2705.

Conrad M., Bubb V.J., Schlegel R. **1993**. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol.* **67**: 6170–6178.

Cowell I.G., Dixon K.H., Pemble S.E., Ketterer B., Taylor J.B. **1988**. The structure of the human glutathione S-transferase pi gene. *Biochem. J.* **255**: 79-83.

Cui H., Shen J., Lu D., Zhang T., Zhang W., Sun D., Wang P.G. **2008**. 4-Aryl-1,3,2-oxathiazolylum-5-olate: a novel GST inhibitor to release JNK and activate c-Jun for cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* **62**: 509-15.

Cumming R.C., Lightfoot J., Beard K., Youssoufian H., O'Brien P.J., Buchwald M. **2001**. Fanconi anemia group C protein prevents apoptosis in hematopoietic cells through redox regulation of GSTP1. *Nat Met.* **7**: 814-20.

Dang D.T., Chen F., Kohli M., Rago C., Cummins J.M., Dang L.H. **2005**. Glutathione S-transferase pi1 promotes tumorigenicity in HCT116 human colon cancer cells. *Cancer Res.* **65**: 9485-9494.

De Luca A., Mangiacasale R., Severino A., Malquori L., Baldi A., Palena A., Mileo A.M., Lavia P., Paggi M.G. **2003**. E1A Deregulates the Centrosome Cycle in a Ran GTPase-dependent Manner. *Cancer Res.* **63**: 1430-1437.

Demeret C., Desaintes C., Yaniv M., Thierry F. **1997**. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J Virol.* **71**: 9343–9349.

Desikan R., A-H-Mackerness S., Hancock J.T., Neill S.J. **2001**. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* **127**: 159-172.

De Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., Zur Hausen H. **2004**. Classification of papillomaviruses. *Virology* **324**: 17-27.

Di Maio D. and Mattoon D. **2001**. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene* **20**: 7866–7873.

Dixon E.P., Pahel G.L., Rocque W.J., Barnes J.A., Lobe D.C., Hanlon M.H., Alexander K.A., Chao S.F., Lindley K., Phelps W.C. **2000**. The E1 helicase of human papillomavirus type 11 binds to the origin of replication with low sequence specificity. *Virology* **270**: 345–357.

Doorbar J., Ely S., Sterling J., McLean C., Crawford L. **1991**. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* **352**: 824–827.

Dyson N., Howley P.M., Munger K., Harlow E. **1989**. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**: 934–937.

Dyson N., Guida P., Munger K., Harlow E. **1992**. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol.* **66**: 6893–6902.

Dyson N. **1998**. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* **12**: 2245-2262.

Duensing S., Lee L.Y., Duensing A., Basile J., Piboonniyom S., Gonzalez S., Crum C.P., Munger K. **2000**. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**: 10002-7.

Elsby R, Kitteringham NR, Goldring CE, Lovatt CA, Chamberlain M, Henderson CJ, Wolf CR, Park BK. **2003**. Increased constitutive c-Jun N-terminal kinase signaling in mice lacking glutathione S-transferase Pi. *J Biol Chem.* **278**: 22243-9.

Evans J.F., Leville C., Mancini J.A., Prasit P., Therien M., Zamboni R., Gauthier J.Y., Fortin R., Charleson P., MacIntyre D.E. **1991**. 5-lipoxygenaseactivating protein is the target of a quinoline class of leukotriene synthesis inhibitors. *Mol Pharmacol.* **40**: 22-27.

Fehrman F. and Laimins L.A. **2003**. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* **22**: 5201-5207.



Fehrman F., Klumpp D.J., Laimins L.A. **2003**. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J Virol.* **77**: 2819–2831.

Felsani A., Mileo A.M., Paggi M.G. **2006**. Retinoblastoma protein as a key target of the small DNA virus oncoproteins. *Oncogene* **25**: 5277-5285.

Filippova M, Parkhurst L, Duerksen-Hughes PJ. **2004**. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem.* **279**: 25729-44.

Finzer P., Aguilar-Lemarroy A., Rösl F. **2002**. The role of human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis. *Cancer Lett.* **188**: 15-24.

Flohé L. and Günzler W.A. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **105**: 114-21.

Flores E.R., Allen-Hoffmann B.L., Lee D., Lambert P.F. **2000**. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *J Virol.* **74**: 6622–6631.

Frattini M.G. and Laimins L.A. **1994**. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci. USA* **91**: 12398–12402.

Frattini M.G., Lim H.B., Doorbar J., Laimins L.A. **1997**. Induction of human papillomavirus type 18 late gene expression and genomic amplification in organotypic cultures from transfected DNA templates. *J Virol.* **71**: 7068–7072.

Funk J.O., Waga S., Harry J.B., Espling E., Stillman B., Galloway D.A. **1997**. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* **11**: 2090–2100.

Gage J.R., Meyers C., Wettstein F.O. **1990**. The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J Virol.* **64**: 723-730.

Garnett T.O. and Duerksen-Hughes P.J. **2006**. Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Arch Virol.* **151**: 2321-35.

Geysen H.M., Meloen R.H., Barteling S.J. **1984**. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci. USA* **81**: 3998-4002.

Gonzalez S.L., Stremlau M., He X., Basile J.R., Munger K. **2001**. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol.* **75**: 7583–7591.

Goodwin E.C. DiMaio D. **2000**. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc Natl Acad Sci. USA* **97**: 12513–12518.

Grassman K., Rapp B., Maschek H., Petry K.U., Iftner T. **1996**. Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J Virol.* **70**: 2339-49.

Greenberg R.A., O'Hagan R.C., Deng H., Xiao Q., Hann S.R., Adams R.R., Lichtsteiner S., Chin L., Morin G.B., DePinho R.A. **1999**. Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-Myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene* **18**: 1219–1226.

Greenfield I., Nickerson J., Penman S., Stanley M. **1991**. Human papillomavirus 16 E7 protein is associated with the nuclear matrix. *Proc Natl Aca. Sci. USA* **88**: 11217-11221.

Hall A.G., Autzen P., Cattani A.R., Malcolm A.J., Cole M., Kernahan J., Reid M.M. **1994**. Expression of mu class glutathione S-transferase correlates with event-free survival in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* **54**: 5251-5254.

Hayes J.D. and Pulford D.J. **1995**. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **30**: 445-600.

Hayes J.D. and McLellan L.I. **1999**. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* **31**: 273-300.

Heck D.V., Yee C.L., Howley P.M., Munger K. **1992**. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc. Natl Acad Sci USA* **89**: 4442–4446.

Helt A.M. and Galloway D.A. **2001**. Destabilization of the retinoblastoma tumor suppressor by human papillomavirus type 16 E7 is not sufficient to overcome cell cycle arrest in human keratinocytes. *J Virol.* **75**: 6737–6747.

Helt A.M. and Galloway D.A. **2003**. Mechanism by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins. *Carcinogenesis* **24**: 159-169.

Henderson C.J., Smith A.G., Ure J., Brown K., Bacon E.J., Wolf C.R. **1998a**. Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**: 5275-80.

Henderson C.J., McLaren A.W., Moffat G.J., Bacon E.J., Wolf C.R. **1998b**. Pi-class glutathione S-transferase: regulation and function. *Chem Biol Interact.* 111-112: 69-82.

Holm P.J., Morgenstern R., Hebert H. **2002**. The 3-D structure of microsomal glutathione transferase 1 at 6 Å resolution as determined by electron crystallography of p22(1)2(1) crystals. *Biochim Biophys. Acta* **1594**: 276-285.

Hopfl R., Heim K., Christensen N., Zumbach K., Wieland U., Volgger B., Widschwendter A., Haimbuchner S., Muller-Holzner E., Pawlita M., Pfister H., Fritsch P. **2000**. Spontaneous regression of CIN and delayedtype hypersensitivity to HPV-16 oncoprotein E7. *Lancet* **356**: 1985–1986.

Howley P.M. **1996**. Papillomaviridae: the viruses and their replication,. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed. p. 947–978 Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.

Hubbert N.L., Sedman S.A., Schiller J.T. **1992**. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J Virol.* **66**: 6237–6241.

Hughes F.J. and Romanos M.A. **1993**. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res.* **21**: 5817–5823.

Huibregtse J.M., Scheffner M., Howley P.M. **1991**. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* **10**: 4129–4135.

Hummel M., Hudson J.B., Laimins L.A. **1992**. Differentiation induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J Virol.* **66**: 6070–6080.

Jakobsson P.J., Morgenstern R., Mancini J., Ford-Hutchinson A., Persson B. **1999**. Common structural features of MAPEG-a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci.* **8**: 689-692.

Jenson A.B., Kurman R.J., Lancaster W.D. **1991**. Tissue effects of and host response to human papillomavirus infection. *Dermatol. Clin.* **9**: 203–209.

Jeon S. and Lambert P.F. **1995**. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci. USA* **92**: 1654–1658.

Jeon S., Allen-Hoffmann B.L., Lambert P.F. **1995**. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol.* **69**: 2989–2997.

Jentzsch A.M., Bachmann H., Furst P., Biesalski H.K. **1996**. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med.* **20**: 251-256.

Jewers R.J., Hildebrandt P., Ludlow J.W., Kell B., McCance D.J. **1992**. Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes. *J Virol.* **66**: 1329–1335.

Jones D.L. and Munger K. **1997**. Analysis of the p53-mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol.* **71**: 2905–2912.

Jones D.L., Thompson D.A., Munger K. **1997**. Destabilization of the RB tumor suppressor and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis. *Virology* **239**: 97–107.

Jones D.L., Alani R.M., Munger K. **1997**. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human

keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* **11**: 2101–2111.

Jordan M. and Wurm F. **2004**. Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. *Methods* **33**: 136-143.

Kinsella T.M. and Nolan G.P. **1996**. Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum Gene Ther.* **7**: 1405-13.

Kaznelson D.W., Bruun S., Monrad A., Gjerløv S., Birk J., Röpke C., Norrild B. **2004**. Simultaneous human papilloma virus type 16 E7 and cdk inhibitor p21 expression induces apoptosis and cathepsin B activation. *Virology*. **320**: 301-12.

Klingelhutz A.J., S.A. Foster, J.K. McDougall. **1996**. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* **380**: 79–82

Klumpp D.J. and Laimins L.A. **1999**. Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. *Virology* **257**: 239–246.

Ladner J.E., Abdulaev N.G., Kakuev D.L., Tordova M., Ridge K.D., Gilliland GL. **1999**. The three-dimensional structures of two isoforms of nucleoside diphosphate kinase from bovine retina. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **55**: 1127-35.

Ladner J.E., Parsons J.F., Rife C.L., Gilliland J.L., Armstrong R.N. **2004**. Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class Kappa enzyme rGSTK1-1. *Biochemistry* **43**: 352-361.

Laimins L.A. **1998**. Regulation of transcription and replication by human papillomaviruses,. *In* D. J. McCance (ed.) p. 201–223. Human tumor viruses. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Lavia P, Mileo AM, Giordano A, Paggi MG. **2003**. Emerging roles of DNA tumor viruses in cell proliferation: new insights into genomic instability. *Oncogene*. **22**: 6508-16.

Leiers B., Kampkötter A., Grevelding C.G., Link C.D, Johnoson T.E., Henkle-Dührsen K. **2003**. A stress-responsive glutathione S-transferase confers resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med.* **34**: 1405-1415.

Lin X. and Nelson W.G. **2003**. Methyl-CpG-binding domain protein-2 mediates transcriptional repression associated with hypermethylated GSTP1 CpG islands in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.* **63**: 498-504.

Liu Y., Chen J.J., Gao Q., Dalal S., Hong Y., Mansur C.P., Band V., Androphy E.J. **1999**. Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. *J Virol.* **73**: 7297-7307.

Liu X., Clements A., Zhao K., Marmorstein R. **2006**. Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Biol Chem.* **281**: 578-86.

Lo Y.Y., Wong J.M., Cruz T.F. **1996**. Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem.* **271**: 15703-7.

Lo Bello M., Petruzzelli R., De Stefano E., Tenedini C., Barra D., Federici G. **1990**. Identification of a highly reactive sulphydryl group in human placental glutathione transferase by a site-directed fluorescent reagent. *FEBS Lett.* **263**: 389-91.

Longworth M.S. and Laimins L.A. **2004a**. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol. Mol Biol Rev.* **68**: 362-372.

Longworth M.S. and Laimins L.A. **2004b**. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol.* **78**: 3533-3541.

Lu J.Z., Sun Y.N., Rose R.C., Bonnef W., McCance D.J. **1993**. Two E2 binding sites (E2BS) alone or one E2BS plus an A/T-rich region are minimal requirements for the replication of the human papillomavirus type 11 origin. *J Virol.* **67**: 7131-7139.

Maeji N.J., Bray A.M., Geysen H.M. **1990**. Multi-pin peptide synthesis strategy for T cell determinant analysis. *J Immunol Methods* **134**: 23-33.

Magal S.S., Jackman A., Pei X.F., Schlegel R., Sherman L. **1998**. Induction of apoptosis in human keratinocytes containing mutated p53 alleles and its inhibition by both the E6 and E7 oncoproteins. *Int J Cancer* **75**: 96-104.

Marchese C., Maresca V., Cardinali G., Belleudi F., Ceccarelli S., Bellocchi M., Frati L., Torrisi M.R., Picardo M. **2003**. UVB-induced activation and internalization of keratinocyte growth factor receptor. *Oncogene*. **22**: 2422-31.

Martin L.G., Demers G.W., Galloway D.A. **1998**. Disruption of the G1/S transition in human papillomavirus type 16 E7-expressing human cells is associated with altered regulation of cyclin E. *J Virol*. **72**: 975-985.

Massimi P. and Banks L. **2000**. Differential phosphorylation of the HPV-16 E7 oncoprotein during the cell cycle. *Virology* **276**: 388-394.

Masterson P.J., Stanley M.A., Lewis A.P., Romanos M.A. **1998**. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J Virol*. **72**: 7407-7419.

Matsushita N., Aritake K., Takada A., Hizue M., Hayashi K., Mitsui K., Hayashi M., Hirotsu I., Kimura Y., Tani T., Nakajima H. **1998**. Pharmacological studies on the novel antiallergic drug HQL-79: II. Elucidation of mechanisms for antiallergic and antiasthmatic effects. *Jpn J Pharmacol*. **78**: 11-22.

McCance D.J. **2005**. Transcriptional regulation by human papillomaviruses. *Curr Opin Genet Dev*. **15**: 515-519.

McIlwain C.C., Townsend D.M., Tew K.D. **2006**. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene* **25**: 1639-1648.

McIntyre M.C., Frattini M.G., Grossman S.R., Laimins L.A. **1993**. Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *J Virol*. **67**: 3142-3150.

McIntyre M.C., Ruesch M.N., Laimins L.A. **1996**. Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology* **215**: 73-82.

McLaughlin-Drubin M.E. and Münger K. **2008**. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology* [Epub ahead of print].

McLaughlin-Drubin M.E. and Munger K. **2008**. Viruses associated with human cancer. *Biochim Biophys Acta*. **1782**: 127-50.

McMurray H.R., Nguyen D., Westbrook T.F., McCance D.J. **2000**. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Path.* **82**: 15-33.

Menegon A., Board P.G., Blackburn A.C., Mellick G.D., Le Coteur D.G. **1998**. Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase polymorphisms. *Lancet* **352**: 1344-1346.

Mileo A.M., Piombino E., Severino A., Tritarelli A., Paggi M.G., Lombardi D. **2006**. Multiple interference of the human papillomavirus-16 E7 oncoprotein with the functional role of the metastasis suppressor Nm23-H1 protein. *J Bioenerg Biomembr.* **38**: 215-25.

Missero C., Di Cunto F., Kiyokawa H., Koff A., Dotto G.P. **1996**. The absence of p21Cip1/WAF1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression. *Genes Dev.* **10**: 3065–3075.

Moscow J.A., Townsend A.J., Cowan K.H. **1989**. Elevation of pi class glutathione S-transferase activity in human breast cancer cells by transfection of the GST pi gene and its effect on sensitivity to toxins. *Mol Pharmacol.* **36**: 22-8.

Muller F., Giroglou T., Sapp M. **1997**. Characterization of the DNA binding activity of the E1 and E2 proteins and the E1/E2 complex of human papillomavirus type 33. *J Gen Virol.* **78**: 911–915.

Munger K., Basile J.R., Duensing S., Eichten A., Gonzalez S.L., Grace M., Zacny V.L. **2001**. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* **20**: 7888–7898.

Munger K. **2002**. The role of human papillomaviruses in human cancers. *Front Biosci.* **7**: 641-649.

Munger K., Baldwin A., Edwards K.M., Hayakawa H., Nguyen C.L., Owens M., Grace M., Huh K.W. **2004**. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* **78**: 11451-11460.

Munoz N., Bosch F.X., de Sanjose S., Herrero R., Castellsague X., Shah K.V., Snijders P.J., Meijer C.J. **2003**. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* **348**: 518-527.

Nelson C.P., Kidd L.C., Sauvageot J., Isaacs W.B., De Marzo A.M., Groopman J.D., Nelson W.G., Kensler T.W. **2001**. Protection against 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine cytotoxicity and



DNA adduct formation in human prostate by glutathione S-transferase P1. *Cancer Res.* **61**: 103-9.

Nose K., Shibamura M., Kikuchi K., Kageyama H., Sakiyama S., Kuroki T. **1991**. Transcriptional activation of early-response genes by hydrogen peroxide in a mouse osteoblastic cell line. *Eur J Biochem.* **201**: 99-106.

O'Brien M.L. and Tew K.D. **1996**. Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. *Eur J Cancer* **32**: 967-978.

Oakley A.J., Lo Bello M., Battistoni A., Ricci G., Rossjohn J., Villar H.O., Parker M.W. **1997**. The structures of human glutathione transferase P1-1 in complex with glutathione and various inhibitors at high resolution. *J Mol Biol.* **274**: 84-100.

Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P. **2001**. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* **94**: 153-156.

Pass F., Reissig M., Shah K.V., Eisinger M., Orth G. **1977**. Identification of an immunologically distinct papillomavirus from lesions of epidermodysplasia verruciformis. *J Natl Cancer Inst.* **59**: 1107-1112.

Passi S., Morrone A., De Luca C., Picardo M., Ippolito F. **1991**. Blood levels of vitamin E, polyunsaturated fatty acids of phospholipids, lipoperoxides and glutathione peroxidase in patients affected with seborrheic dermatitis. *J Dermatol Sci.* **2**: 171-8.

Phelps W.C., Yee C.L., Munger K., Howley P.M. **1988**. The human papillomavirus type 16 E7 encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* **53**: 539-547.

Phelps W.C., Munger K., Yee C.L., Barnes J.A., Howley P.M. **1992**. Structure-function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol.* **66**: 2418-27.

Pisani P., Bray F., Parkin D.M. **2002**. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer* **97**: 72-81.

Ricci G., Del Boccio G., Pennelli A., Lo Bello M., Petruzzelli R., Caccuri A.M., Barra D., Federici G. **1991**. Redox forms of human placenta glutathione transferase. *J Biol Chem.* **266**: 21409-15-

Ricci G., Caccuri A.M., Lo Bello M., Rosato N., Mei G., Nicotra M., Chiessi E., Mazzetti A.P., Federici G. **1996**. Structural flexibility modulates the activity of human glutathione transferase P1-1. Role of helix 2 flexibility in the catalytic mechanism. *J Biol Chem.* **271**: 16187-92.

Roberts S. **2006**. The E4 protein-A late starter, In CAMPO S., Papillomavirus Research, Caister Academy Press, Wymondham: 83-96.

Ryoo K., Huh S.H., Lee Y.H., Yoon K.W., Cho S.G., Choi E.J. **2004**. Negative regulation of MEKK1-induced signaling by glutathione S-transferase Mu. *J Biol Chem.* **279**: 43589-94.

Robinson A., Huttley G.A., Booth H.S., Board P.G. **2004**. Modelling and bioinformatics studies of the human Kappa class glutathione transferase predict a novel third transferase family with homology to prokaryotic 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerases. *Biochem J.* **379**: 541-552.

Sali A. and Blundell T.L. **1993**. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol.* **234**: 779-815.

Schmitt A., Harry J.B., Rapp B., Wettstein F.O., Iftner T. **1994**. Comparison of the properties of the E6 and E7 genes of low- and high-risk cutaneous papillomaviruses reveals strongly transforming and high Rb binding activity for the E7 protein of the low-risk human papillomavirus type 1. *J Virol.* **68**: 7051-7059.

Sedman J. and Stenlund A. **1998**. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J Virol.* **72**: 6893-6897.

Seo Y.S., Muller F., Lusky M., Hurwitz J. **1993**. Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proc Natl Acad Sci. USA* **90**: 702-706.

Severino A., Abbruzzese C., Manente L., Valderas A.A., Mattarocci S., Federico A., Starace G., Chersi A., Mileo A.M., Paggi M.G. **2007**. Human papillomavirus-16 E7 interacts with Siva-1 and modulates apoptosis in HaCaT human immortalized keratinocytes. *J Cell Physiol.* **212**: 118-25.

Shen H.X., Tamai K., Satoh K., Hatayama I., Tsuchida S., Sato K. **1991**. Modulation of class Pi glutathione transferase activity by sulfhydryl group modification. *Arch Biochem Biophys.* **286**: 178-82.

Shen H., Tsuchida S., Tamai K., Sato K. **1993**. Identification of cysteine residues involved in disulfide formation in the inactivation of glutathione transferase P-form by hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys.* **300**: 137-141.

Shim J.H., Kim K.H., Cho Y.S., Choi H.S., Song E.Y., Myung P.K., Kang J.S., Suh S.K., Park S.N., Yoon D.Y. **2008**. Protective effect of oxidative stress in HaCaT keratinocytes expressing E7 oncogene. *Amino Acids.* **34**: 135-41.

Sibbet G., Romero-Graillet C., Meneguzzi G., Campo M.S. **2000**. Alpha 6 integrin is not the obligatory cell receptor for bovine papillomavirus type 4, *J Gen Virol.* **81**: 327-34.

Simbulan-Rosenthal C.M., Daher A., Trabosh V., Chen W.C., Gerstel D., Soeda E., Rosenthal D.S. **2006**. Id3 induces a caspase-3- and -9-dependent apoptosis and mediates UVB sensitization of HPV16 E6/7 immortalized human keratinocytes. *Oncogene.* **25**: 3649-60.

Smotkin D. and Wettstein F.O. **1987**. The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmatic phosphoprotein. *J Virol.* **61**: 1686-89.

Spitz D.R. and Oberley L.W. **1989**. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem.* **179**: 8-18.

Steger G. and Corbach S. **1997**. Dose-dependent regulation of the early promoter of HPV 18 by the viral E2 protein. *J Virol.* **71**: 50-58.

Stöppler H., Stöppler M.C., Johnson E., Simbulan-Rosenthal C.M., Smulson M.E., Iyer S., Rosenthal D.S., Schlegel R. **1998**. The E7 protein of human papillomavirus type 16 sensitizes primary human keratinocytes to apoptosis. *Oncogene.* **17**: 1207-14.

Strange R.C. and Fryer A.A. **1999**. The glutathione S-transferases : influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC Sci Publ* **148**: 231-249.

Tamai K., Satoh K., Tsuchida S., Hatayama I., Maki T., Sato K. **1990**. Specific inactivation of glutathione S-transferases in class Pi by SH-modifiers. *Biochem Biophys Res Commun.* **167**: 331-38.

Tew K.D. **1994**. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res.* **54**: 4313-4320.

Tew K.D., Monks A., Barone L., Rosser D., Akerman G., Montali J.A., Wheatley J.B., Schmidt D.E. Jr. **1996**. Glutathione-associated enzymes in the human cell lines of the National Cancer Institute Drug Screening Program. *Mol Pharmacol.* **50**: 149-59.

Thierry F. and Yaniv M. **1987**. The BPV-1 E2 trans-acting protein can be either an activator or repressor of the HPV-18 regulatory region. *EMBO J.* **6**: 3391–3397.

Thompson D.A., Belinsky G., Chang T.H., Jones D.L., Schlegel R., Munger K. **1997**. The human papillomavirus-16 E6 oncoprotein decreases the vigilance of mitotic checkpoints. *Oncogene* **15**: 3025-35.

Thompson D.A., Zacny V., Belinsky G.S., Classon M., Jones D.L., Schlegel R., Munger K. **2001**. The HPV E7 oncoprotein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in normal human fibroblasts. *Oncogene.* **20**: 3629-40.

Thorland E.C., Myers S.L., Gostout B.S., Smith D.I. 2003. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene* **22**: 1225–1237.

Townsend D.M. and Tew K.D. **2003**. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* **22**: 7369-75.

Turella P., Cerella C., Filomeni G., Bullo A., De Maria F., Ghibelli L., Ciriolo M.R., Cianfriglia M., Mattei M., Federici G., Ricci G., Caccuri A.M. **2007**. Proapoptotic activity of new glutathione S-transferase inhibitors. *Cancer Res.* **65**: 3751-61.

Veal E.A., Toone W.M., Jones N., Morgan B.A. **2002**. Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* **277**: 35523-35531.

Walboomers J.M., Jacobs M.V., Manos M.M., Bosch F.X., Kummer J.A., Shah K.V., Snijders P.J., Peto J., Meijer C.J., Munoz N. **1999**. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* **189**: 12–19.

Wang T., Arifoglu P., Ronai Z., Tew K.D. **2001**. Glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1) inhibits c-Jun N-terminal kinase (JNK1) signaling through interaction with the C terminus. *J Biol Chem.* **276**: 20999-21003.

Wang M.C., Bohmann D., Jasper H. **2003**. JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *Dev Cell*. **5**: 811-816.

Whiteside M.A., Siegel E.M., Unger E.R. **2008**. Human papillomavirus and molecular considerations for cancer risk. *Cancer*. **113**: 2981-94.

Wilhelm D., Bender K., Knebel A., Angel P. **1997**. The level of intracellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transduction pathways including Jun N-terminal protein kinases and p38 kinase by alkylating agents. *Mol Cell Biol*. **17**: 4792-800.

Wu Y., Fan Y., Xue B., Luo L., Shen J., Zhang S., Jiang Y., Yin Z. **2006**. Human glutathione S-transferase P1-1 interacts with TRAF2 and regulates TRAF2-ASK1 signals. *Oncogene* **25**: 5787-800.

Xue B., Wu Y., Yin Z., Zhang H., Sun S., Yi T., Luo L. **2005**. Regulation of lipopolysaccharide-induced inflammatory response by glutathione S-transferase P1 in RAW264.7 cells. *FEBS Lett*. **579**: 4081-7.

Yang L., Mohr I., Fouts E., Lim D.A., Nohaile M., Botchan M. **1993**. The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci. USA* **90**: 5086–5090.

Yin Z., Ivanov V.N., Habelhah H., Tew K., Ronai Z. **2000**. Glutathione S-transferase p elicits protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases. *Cancer Res*. **60**: 4053-7.

Yuan H., Fu F., Zhuo J., Wang W., Nishitani J., An D.S., Chen I.S., Liu X. **2005**. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins upregulate c-IAP2 gene expression and confer resistance to apoptosis. *Oncogene*. **24**: 5069-78.

Zatsepina O., Braspenning J., Robberson D., Hajibagheri M.A., Blight K.J., Ely S., Hibma M., Spitkovsky D., Trendelenburg M., Crawford L., Tommasino M. **1997**. The human papillomavirus type 16- E7 protein is associated with the nucleus in mammalian and yeast cells. *Oncogene* **14**: 1137-45.

Zerfass-Thome K., Zwerschke W., Mannhardt B., Tindle R., Botz J.W., Jansen-Durr P. **1996**. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* **13**: 2323–2330.

Ziegert C., Wentzensen N., Vinokurova S., Kisseljov F., Einenkel J., Hoeckel M., von Knebel Doeberitz M. **2003**. A comprehensive analysis of

HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene* **22**: 3977–3984.

Zimmermann H., Degenkolbe R., Bernard H.U., O'Connor M.J. **1999**. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol.* **73**: 6209–6219.

zur Hausen H. **1996**. Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.* **1288**: F55–F78.

zur Hausen H. **2000**. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* **92**: 690–698.

zur Hausen H. **2002**. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* **2**: 342–350.

Zwerschke W. and Jansen-Durr P. **2000**. Cell transformation by the E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16: interactions with nuclear and cytoplasmic target proteins. *Adv Cancer Res.* **78**: 1–29.